

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
 INSTITUT NATIONAL  
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
 PARIS

(11) N° de publication :  
 (à utiliser que pour les  
 commandes de reproduction)

**2 835 698**

(21) N° d'enregistrement national :

**02 13678**

(51) Int Cl<sup>7</sup> : A 01 H 1/04, G 01 N 33/68, A 01 H 5/00, 1/06, C 12 Q  
 1/68, C 07 K 14/415, 16/16, C 12 N 15/82, 5/10

(12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 31.10.02.

(30) Priorité : 08.02.02 FR 00201583.

(71) Demandeur(s) : GENOPLANTE-VALOR Société par  
 actions simplifiée — FR.

(43) Date de mise à la disposition du public de la  
 demande : 15.08.03 Bulletin 03/33.

(72) Inventeur(s) : CARANTA CAROLE, RUFFEL  
 SANDRINE, BENDAHMANE ABDELHAFID, PALLOIX  
 ALAIN et ROBIGLIA CHRISTOPHE.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de  
 recherche préliminaire : Ce dernier n'a pas été  
 établi à la date de publication de la demande.

(73) Titulaire(s) :

(60) Références à d'autres documents nationaux  
 apparentés :

(74) Mandataire(s) : CABINET ORES.

(54) PROCÉDÉ DE SÉLECTION OU D'OBTENTION DE PLANTES RESISTANTES AUX POTYVIRUS ET  
 SEQUENCES MARQUANT OU CODANT CETTE RÉSISTANCE.

(57) La présente invention concerne l'obtention de plantes  
 résistantes aux potyvirus présentant une ou plusieurs muta-  
 tions dans une région conservée du facteur de traduction  
 eIF4E, définie par la séquence générale (I) suivante:

DX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>KSX<sub>5</sub>QX<sub>6</sub>AWGSSX<sub>7</sub>RX<sub>8</sub>X<sub>9</sub>YTFSX<sub>10</sub>VEX<sub>11</sub>  
 FWX<sub>12</sub>X<sub>13</sub>YNNIHX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>PSKLX<sub>16</sub>GAD dans laquelle:

- X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub>, X<sub>14</sub>, X<sub>15</sub> et X<sub>16</sub>

représentent chacun un acide aminé neutre;

- X<sub>5</sub> et X<sub>14</sub> représentent un acide aminé basique;

- X<sub>11</sub> représente un acide aminé acide;

- D, K, S, Q, A, W, G, R, Y, T, F, V, E, N, I, H, P, et L ont  
 leur signification usuelle en code I-flettre.



La présente invention concerne un procédé de sélection ou d'obtention de plantes résistantes aux potyvirus. Le procédé est particulièrement applicable aux plantes de la famille des solanacées, des cucurbitacées, des crucifères et des composées. L'invention comprend également les séquences permettant de conférer la résistance aux potyvirus et/ou 5 de marquer les gènes de résistance ou de sensibilité à ces potyvirus.

Le groupe des potyvirus dont le membre type est le virus Y de la pomme de terre ou PVY pour Potato Virus Y est le groupe de virus végétaux le plus important. En effet, les potyvirus sont capables d'infecter plus de 30 familles de plantes actuellement recensées. Ce groupe comprend au moins 180 membres ce qui correspond au tiers des 10 virus de plantes actuellement connus. La transmission des potyvirus est réalisée par les pucerons (par exemple, *Myzus persicae*) selon le mode non-persistant. Les symptômes causés par les potyvirus sont des anomalies de coloration des feuilles (mosaïques, jaunissement des nervures), des déformations des feuilles, des nécroses nerveuses pouvant conduire à la nécrose de la plante entière, et des réductions importantes de la taille de la 15 plante malade influant fortement sur la productivité.

Les solanacées, cucurbitacées, crucifères et composées sont particulièrement sensibles aux potyvirus. Les solanacées et plus particulièrement la tomate et le piment (ou poivron) sont infectées par au moins sept potyvirus distincts à travers le monde : le virus Y de la pomme de terre (PVY) est présent sur l'ensemble des zones de 20 culture alors que les autres sont cantonnés à un continent (Tobacco Etch virus, Pepper Mottle Virus et Perou Tomato Virus sur le continent américain, Pepper Veinal Mottle Virus et Potyvirus E en Afrique, et Chili Veinal Mottle Virus en Asie). Cette compartimentation n'est cependant plus absolue, plusieurs potyvirus ayant été identifiés hors de leur zone d'origine. En France, et plus généralement dans le bassin méditerranéen, 25 le potyvirus prédominant est le PVY. Apparues dans les années 70, les épidémies de PVY se sont développées dans les cultures de plein champ puis dans les cultures sous abris où ont été mis en évidence, à partir de 1982, de nouveaux isolats de PVY causant des symptômes de nécrose particulièrement graves sur la tomate (Gebre-Selassie *et al.*, 1987). Pour certains de ces potyvirus, il est possible de classer les isolats selon leur aptitude à 30 contourner des allèles de résistance. C'est le cas du PVY vis-à-vis du gène *pvr2* chez le piment, seul gène de résistance utilisé de longue date par les sélectionneurs mais contourné dans les zones du pourtour méditerranéen et dans les zones tropicales. Malgré la prédominance du PVY en France, l'internationalisation du marché de la semence rend nécessaire l'utilisation de gènes contrôlant la résistance à ces différents potyvirus par les 35 sélectionneurs qui vendent leurs semences à l'étranger. Plus généralement, considérant l'importance économique des infections par potyvirus et l'absence de moyens directs de lutte contre ce type d'infection, la recherche de variétés végétales résistantes constitue un des axes principaux de l'amélioration des plantes.

Les potyvirus ont une structure filamenteuse non-enveloppée (Langenberg et Zhang, 1997) de 680 à 900 nm de long et de 11 à 15 nm de large (Dougherty et Carrington, 1988 ; Riechmann et al., 1992). Le génome viral est constitué d'un ARN simple brin sens d'une longueur approximative de 10 kb. L'ARN simple brin possède à son extrémité 3' une queue poly A et se lie en 5' à une protéine virale appelée VPg (Murphy et al., 1990, Takahashi et al., 1997). L'ARN viral code pour 10 protéines impliquées dans le clivage des polyprotéines, la réPLICATION du génome, le mouvement de cellule-à-cellule et le mouvement longue distance, la transmission par pucerons... La lutte contre les virus n'est réalisable qu'indirectement. En effet, il est seulement possible d'éliminer le vecteur de la maladie (les pucerons dans ce cas) ou de cultiver des variétés résistantes à l'infection virale et/ou aux vecteurs.

Face à une agression par un pathogène (virus, bactéries, champignons ou nématodes), la plante possède plusieurs stratégies pour se défendre ou résister à l'infection. Parmi les stratégies de défense, la plante peut mettre en place :

- 15 - des systèmes de défense mécaniques en élaborant et en renforçant des barrières physiques constituées d'une cuticule épaisse sur les feuilles et/ou d'un dépôt de callose ou de lignines sur les parois cellulaires. Ainsi, l'entrée et le mouvement des pathogènes dans la plante est rendu plus difficile.
- 20 - des systèmes de défense chimiques ou biochimiques en synthétisant des composés toxiques comme par exemple, les tanins, les phytoalexines et différents complexes protéiques.

Parmi les stratégies de résistance, on distingue la résistance non-hôte (lorsque toutes les entités d'une espèce sont résistantes à un pathogène donné) de la résistance hôte (lorsque au moins une entité de l'espèce est sensible à une souche de l'agent pathogène). La résistance hôte, la plus connue à ce jour et la mieux caractérisée, est celle faisant intervenir un gène majeur, dominant. Lorsque le gène majeur se trouve en présence d'un gène spécifique d'avirulence de l'agent pathogène, l'incompatibilité entre la plante et le pathogène est mise en place et la plante est résistante. Cette interaction, décrite par Flor (1955) est également appelée "modèle gène-à-gène" et est très souvent associée à une 25 nécrose localisée du tissu végétal au site d'infection (réaction d'hypersensibilité). Bien qu'assez largement répandu, ce modèle "gène-à-gène" n'est pas universel car certains systèmes de résistance décrits ne fonctionnent pas selon ce modèle, les différences résidant notamment dans le mode d'action du gène de résistance. Il existe des gènes récessifs, superdominants ou exerçant une dominance incomplète. Plusieurs gènes d'avirulence 30 peuvent interagir avec un même gène de résistance. De nombreuses résistances sont également polygéniques, plusieurs gènes présents dans la plante sont alors impliqués dans la résistance, chacun d'eux ayant un effet de protection partielle et pouvant contrôler des mécanismes différents.

A ce jour, de nombreux gènes dominants suivant le modèle "gène-à-gène" ont été clonés. Ils possèdent des structures géniques apparentées bien qu'ils agissent contre des agents pathogènes variés (virus, champignons, bactéries, insectes, nématodes). La présence de domaines conservés a permis de définir 4 grandes classes (Hammond-Kosack et Jones, 1997) de gènes dominants.

Singulièrement, on estime que 40% des résistances aux potyvirus sont récessives alors que dans les autres groupes viraux, cette proportion n'atteint que 20% en moyenne. Fraser (1992) a émis l'hypothèse que les résistances récessives seraient différentes des résistances dominantes de type "gène-à-gène" et résulteraient d'un déficit ou d'une altération spécifique du produit d'un gène de l'hôte nécessaire à l'accomplissement du cycle viral dans la plante. Les allèles dominants de sensibilité correspondraient donc à la disponibilité de ce produit impliqué dans les interactions plante/pathogène.

La protéine VPg des potyvirus joue un rôle prépondérant dans la réplication des potyvirus, en interagissant avec un composant cellulaire nécessaire à la réplication, ce qui induit un contournement des résistances récessives. Cela n'exclut pas que d'autres gènes viraux puissent également intervenir. Ceci a été montré chez les couples TVMV/*Nicotiana tabacum* (gène *va*), PVY/tomate (gène *pol-1*), LMV/Laitue (gène *mo1*) et PSbMV/pois (gène *sbm1*), (Keller et al., 1998, Morel, 2001, Redondo, 2001, Nicolas et al., 1997).

Par ailleurs, Wittman et al. (1997) ont montré qu'une isoforme du facteur d'initiation de la traduction eucaryotique eIF4E d'*Arabidopsis thaliana* interagit avec la protéine virale VPg du virus de la mosaïque du navet (TuMV). Cette même interaction a été détectée entre la VPg du TEV et le eIF4E de tabac et de tomate (Schaad et al., 2000).

Le gène *eIF4E* code pour un facteur eucaryotique d'initiation de la traduction des ARN. eIF4E correspond à une des sous-unités du facteur de traduction eIF4F (chez le germe de blé, il correspond à la sous-unité p26). Le facteur de traduction eIF4E se fixe à la coiffe des ARNm au niveau des m<sup>7</sup>G. La structure de eIF4E se caractérise par une région riche en résidus tryptophane (10 chez *Arabidopsis thaliana*, 11 chez le blé et 12 chez les mammifères). Ces résidus tryptophane seraient impliqués dans la liaison au groupe fonctionnel m<sup>7</sup>G (Rudd, K. et al., 1998). Le facteur de traduction eIF4E est codé par une famille multigénique. Par exemple chez *Arabidopsis thaliana*, 4 copies de eIF4E ont été identifiées (Rodriguez et al., 1998, Robaglia et coll., com. pers.). Ces copies présentent, deux à deux, entre 44 et 82% d'identité.

Tous ces travaux font état de la corrélation entre l'interaction eIF4E/VPg et la sensibilité de la plante aux potyvirus; mais aucun ne souligne ni même ne suggère que cette interaction pourrait conduire à une résistance. Au contraire, il est même indiqué dans Schaad et al., 2000 que l'interaction VPg/eIF4E ne joue pas de rôle dans la résistance, car

les déterminants génétiques de l'interaction VPg/eIF4E sont distincts de ceux permettant aux potyvirus (*via la VPg*) de contourner la résistance.

Il est donc du mérite des Inventeurs, dans un tel état de la technique, d'avoir mis en évidence des protéines eIF4E, ainsi que les gènes correspondants, 5 intervenant dans la résistance ou la sensibilité des plantes aux potyvirus.

Les Inventeurs ont notamment constaté que différentes plantes résistantes aux potyvirus présentaient des mutations ponctuelles situées dans une même région de la protéine eIF4E ; cette région, qui est très conservée entre les protéines eIF4E issues de diverses espèces végétales, notamment de solanacées, est définie par la séquence générale

10 (I) suivante :

DX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>KSX<sub>5</sub>QX<sub>6</sub>AWGSSX<sub>7</sub>RX<sub>8</sub>X<sub>9</sub>YTFSX<sub>10</sub>VEX<sub>11</sub>FWX<sub>12</sub>X<sub>13</sub>YNNIHGX<sub>14</sub>PSKLX<sub>15</sub>X<sub>16</sub>GA  
D

dans laquelle :

- X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub>, X<sub>15</sub>, et X<sub>16</sub> représentent chacun un acide aminé neutre ;
- X<sub>5</sub> et X<sub>14</sub> représentent un acide aminé basique ;
- X<sub>11</sub> représente un acide aminé acide ;
- D, K, S, Q, A, W, G, R, Y, T, F, V, E, N, I, H, P, et L ont leur signification usuelle en code 1-lettre.

20 On définit ici comme « acide aminé neutre », tout acide aminé choisi parmi les suivants : alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, tryptophane, phénylalanine, méthionine, glycine, sérine, thréonine, tyrosine, cystéine, glutamine, asparagine. On définit comme « acide aminé chargé », tout acide aminé choisi parmi les suivants : histidine, lysine, arginine, glutamate, aspartate. Parmi ces acides aminés chargés, 25 histidine, la lysine ou l'arginine sont des acides aminés basiques, et le glutamate et l'aspartate des acides aminés acides.

La séquence (I) est également représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 23

30 Les mutations mises en évidence par les Inventeurs chez le poivron sont les suivantes :

- la substitution de l'acide aminé neutre X<sub>3</sub> de la séquence (I) par un acide aminé basique ;
- la substitution de l'acide aminé neutre X<sub>7</sub> de la séquence (I) par un acide aminé basique ;
- la substitution du résidu aspartate en position C-terminale de la séquence (I) par un acide aminé neutre.

35 La mutation de X<sub>3</sub> a été observée chez deux lignées de poivron présentant deux types différents de résistance aux potyvirus (*pvr2<sup>1</sup>* et *pvr2<sup>2</sup>*) ; les poivrons

présentant le phénotype *pvr2<sup>1</sup>* possèdent en outre la mutation en position X<sub>7</sub>, et les poivrons présentant le phénotype *pvr2<sup>2</sup>* possèdent en outre la mutation en position C-terminale.

Aucune de ces mutations ne concerne des acides aminés très conservés  
 5 entre les protéines eIF4E végétales et les protéines eIF4E animales ou de levure, ou des acides aminés impliqués dans les fonctions essentielles de eIF4E.

Toutefois, il est probable que ces mutations exercent un effet sur l'interaction VPg/eIF4E par modification de la structure de eIF4E au niveau de la ou des régions de celle-ci impliquées dans cette interaction. Cette modification de la structure  
 10 résulte vraisemblablement de la substitution d'acides aminés par des acides aminés de charge différente (remplacement d'acides aminés neutres par des acides aminés chargés, ou à l'inverse d'acides aminés chargés par des acides aminés neutres, ou des acides aminés de charge opposée) qui constitue le point commun à l'ensemble des mutations mises en évidence par les Inventeurs. On peut donc raisonnablement supposer que d'autres  
 15 mutations de même type dans une protéine eIF4E végétale, au niveau de la région définie par la séquence (I) entraîneront des modifications de structure similaire, produisant le même effet sur l'interaction VPg/eIF4E.

En particulier, il apparaît que la substitution d'au moins un des acides aminés neutres X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> ou X<sub>4</sub>, par un acide aminé chargé, notamment un acide aminé basique, joue un rôle important dans la résistance aux potyvirus.  
 20

Ces observations permettent de proposer des outils, notamment des outils génétiques, de criblage et/ou d'obtention de plantes résistantes ou sensibles aux potyvirus.

La présente invention concerne plus particulièrement un procédé de sélection de plantes résistantes aux potyvirus, caractérisé en ce qu'il comprend la détection  
 25 dans les plantes à tester :

- de la présence ou de l'absence d'une protéine eIF4E (dénommée ci-après : « protéine eIF4E de type sauvage ») comprenant une région définie par la séquence (I) ci-dessus, ou d'une séquence codant pour ladite protéine ;
- de la présence ou de l'absence d'une protéine eIF4E mutante comprenant une région dérivée de celle définie par la séquence (I) ci-dessus, par substitution d'au moins un acide aminé neutre de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé, de préférence un acide aminé basique et/ou substitution d'au moins un acide aminé chargé de ladite séquence (I) par un acide aminé neutre ou un acide aminé de charge opposée, ou d'une séquence codant pour ladite protéine ;
- et la sélection des plantes où l'on détecte une protéine eIF4E mutante ou une séquence codant pour ladite protéine, et où l'on ne détecte pas de protéine eIF4E de type sauvage ou de séquence codant pour ladite protéine.

La présente invention a également pour objet un procédé de sélection de plantes utilisables pour l'obtention de plantes résistantes aux potyvirus, caractérisé en ce qu'il comprend la détection dans les plantes à tester de la présence ou de l'absence d'une protéine eIF4E mutante telle que définie ci-dessus ou d'une séquence codant pour ladite protéine, et la sélection des plantes où l'on détecte ladite protéine eIF4E mutante ou une séquence codant pour ladite protéine.

5 Selon un mode de mise en œuvre préféré de l'invention, ladite protéine eIF4E mutante comprend une région décrite de celle définie par la séquence (I) ci-dessus, par :

- 10      a) substitution d'au moins un des acides aminés X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> ou X<sub>4</sub>, de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé, et
- b) substitution d'au moins un des autres acides aminés neutres de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé et/ou substitution d'au moins un acide aminé chargé de ladite séquence (I) par un acide aminé neutre ou un acide aminé de charge opposée.

15 La détection de la présence ou de l'absence d'une protéine eIF4E de type sauvage ou mutante, peut s'effectuer notamment à l'aide d'anticorps spécifiquement dirigés contre la forme recherchée de la protéine eIF4E. Il peut s'agir notamment d'anticorps dirigés soit contre la forme sauvage soit contre la forme mutante de la région de eIF4E définie par la séquence (I).

Pour la détection de la présence ou de l'absence d'une séquence codant pour une protéine eIF4E de type sauvage ou d'une séquence codant pour une protéine eIF4E mutante, on dispose de nombreux outils ; il peut s'agir notamment de polynucléotides dérivés de la séquence du gène *eIF4E* et en particulier de polynucléotides capables de s'hybrider sélectivement soit avec un allèle sauvage soit avec un allèle mutant de *eIF4E*, tels que définis ci-dessus ou de polynucléotides permettant l'amplification de la région de *eIF4E* contenant la mutation recherchée ; il peut s'agir également d'enzymes de restriction reconnaissant une séquence-cible présente dans la forme sauvage, mais non dans la forme mutée (ou l'inverse).

20 La présente invention a ainsi pour objet l'utilisation d'un outil de sélection choisi parmi :

- 30      a) un polynucléotide codant pour une protéine eIF4E de type sauvage ou mutante, telles que définies ci-dessus ;
- b) un polynucléotide complémentaire du polynucléotide a) ;
- c) un fragment d'au moins 10 pb d'un polynucléotide a) ou b) ;
- d) un anticorps dirigé contre une protéine eIF4E de type sauvage ou mutante, telles que définies ci-dessus ;

pour la sélection de plantes résistantes aux potyvirus.

En particulier, l'invention concerne un procédé de sélection de plantes résistantes aux potyvirus caractérisé en ce qu'il comprend la mise en œuvre d'au moins un moyen de sélection choisi dans le groupe des outils génétiques (ou apparentés) comprenant :

- 5 \* A / tout ou partie d'une au moins des séquences sélectionnées dans le sous-groupe comportant :
  - SEQ ID NO: 1,
  - SEQ ID NO: 2,
  - SEQ ID NO: 3 et 4,
- 10 - tout analogue de ces séquences résultant de la dégénérescence du code génétique,
- toute séquence d'ADNc complémentaire d'au moins l'une de ces séquences et/ou d'au moins un de leurs analogues;
- \* B / tout ou partie d'un au moins des produits de transcription des séquences A ;
- \* C / tout ou partie d'un au moins des produits de traduction des séquences A ;
- 15 \* D / tout ou partie d'au moins un anticorps spécifique d'au moins un produit de traduction de C/;
- \* E / et toute association des outils A,B,C,D.

Il est fait référence dans le présent exposé aux séquences SEQ ID NO: 1 à 4 supra et à des séquences SEQ ID NO: 1 à 23 infra. Toutes sont données dans la liste de séquences ci-après.

De préférence, les moyens de sélection sont sélectionnés parmi les sous-groupes d'outils A/ et/ou B/, et plus préférentiellement encore parmi le sous-groupe d'outils A/.

Par ce repérage simple, aisé et fiable de plantes résistantes ou sensibles 25 aux potyvirus, les inventeurs ont ainsi mis au point un nouveau procédé s'appuyant sur l'utilisation de séquences correspondant au gène *eIF4E*.

Le procédé objet de l'invention s'applique particulièrement aux solanacées, cucurbitacées, crucifères et composés et plus précisément aux plantes des genres *Lycopersicon*, *Capsicum*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Lactuca*, *Cucumis*, *Arabidopsis* etc....

Les potyvirus concernés sont, par exemple, le virus Y de la pomme de terre (PVY), au virus de la gravure du tabac (TEV) et/ou au virus de la mosaïque de la laitue (LMV), et/ou au virus de la mosaïque jaune de la courgette (ZYMV) et/ou au virus de la mosaïque du navet (TuMV).

35 Pour mettre en œuvre le procédé selon l'invention, on utilise des séquences nucléotidiques et/ou des séquences peptidiques ou des enzymes de restriction en tant que moyens de détection, sondes ou amorces, pour sélectionner des plantes résistantes ou sensibles aux potyvirus.

Ces moyens de détections comprennent en particulier des sondes ou amorces nucléotidiques.

On entend par « amorce » au sens de la présente invention toute séquence polynucléotidique utilisable pour amplifier spécifiquement et uniquement une séquence d'un gène *eIF4E* susceptible de comprendre une mutation associée à la résistance aux potyvirus. Il s'agit notamment de polynucléotides utilisables pour amplifier tout ou partie de la séquence de *eIF4E* codant pour la région de *eIF4E* définie par la séquence (I), ou de la séquence mutante qui en est dérivée.

On entend par « sonde » au sens de la présente invention toute séquence 10 polynucléotidique, s'hybridant spécifiquement et uniquement avec un gène *eIF4E*. Ceci inclut notamment les séquences nucléotidiques capables de s'hybrider sélectivement soit avec un allèle du gène *eIF4E* associé à la résistance aux potyvirus, soit avec un allèle du gène *eIF4E* associé à la sensibilité aux potyvirus.

15 Ces sondes et ces amorces peuvent être employées comme marqueurs spécifiques des plantes résistantes/sensibles aux potyvirus.

Conformément à l'invention, on est en mesure de faire le tri entre les plantes sensibles et les plantes résistantes aux potyvirus au moyen des outils génétiques (ou apparentés) (A) à (E), voire d'enzymes de restriction spécifiques. Ces dernières seront décrites infra.

20 Les séquences (A) nucléotidiques SEQ ID NO: 1 à 4 correspondent au gène *eIF4E* codant pour un facteur eucaryotique d'initiation de la traduction des ARN. La SEQ ID NO: 4 correspond à un allèle récessif *eIF4E* de résistance à un potyvirus, tandis que SEQ ID NO: 1 à 3 représente plutôt un allèle dominant *eIF4E* de sensibilité à un potyvirus.

25 Il a donc été découvert conformément à l'invention des moyens de sélection ou repères génétiques de résistance ou de sensibilité aux potyvirus. Le procédé de sélection suivant l'invention peut faire intervenir séparément ou ensemble les deux types de moyens de sélection ou repères.

Par exemple, SEQ ID NO: 1 et 2 peuvent provenir respectivement de 30 tabac et de tomate et SEQ ID NO: 3 et 4 de piment.

Naturellement, l'invention englobe également tous les équivalents à ces séquences (A) nucléotidiques SEQ ID NO: 1 à 4, qui conservent la fonction repère génétique *eIF4E* de sensibilité/résistance aux potyvirus propres aux séquences de référence. Pour ce qui concerne les ADN, il s'agit notamment des analogues de 35 dégénérescence génétique et des séquences d'ADNc complémentaires des séquences de référence. Les équivalents polynucléotidiques des séquences (A) de référence se trouvent également parmi leurs produits (ARN) de transcription (B). Les protéines (C) issues de (A) et de (B) constituent d'autres repères intracellulaires permettant la sélection de plantes

résistantes ou sensibles aux potyvirus. Outre les cibles (A), (B), (C), les moyens de sélection de l'invention peuvent aussi être des sondes nucléotidiques aptes à s'hybrider avec des cibles nucléotidiques (A) et (B) complémentaires, ou bien encore des moyens de détection protéiques (anticorps D) aptes à s'apparier avec des cibles antigéniques (C) spécifiques. Il est envisageable de combiner tous ces moyens équivalents (A), (B), (C) & (D) pour former un outil de sélection (E).

Les moyens selon l'invention couvrent également tout fragment des séquences (A), (B), (C) & (D). Par "fragment" on entend, selon l'invention :

- soit un polynucléotide d'au moins 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500 nucléotides contigus de la séquence de référence ; des fragments préférés sont ceux qui sont capables de s'hybrider sélectivement en conditions stringentes avec ladite séquence de référence.
- soit un polyaminoacide d'au moins 3, 6, 10, 15, 30, 60, 100, 150, 200 aminoacides contigus de la séquence de référence ; des fragments préférés sont ceux qui sont capables de s'hybrider sélectivement en conditions stringentes avec ladite séquence de référence.

Selon une modalité avantageuse de l'invention, le procédé est caractérisé en ce que :

- on met en présence au moins un moyen de détection comprenant au moins l'un des outils A,B,C,D,E selon la revendication 1 et/ou au moins une enzyme de restriction, avec au moins un extrait génomique et/ou protéique d'une plante à tester,
- on soumet ledit extrait génomique et/ou protéique, éventuellement apparié et/ou hybridé et/ou digéré, à au moins une séparation,
- on révèle les éventuels appariements et/ou hybridations et/ou digestions susceptibles de se produire,
- et on procède à la lecture des résultats pour conclure finalement sur la présence ou l'absence d'un allèle de résistance (*pvr<sup>2</sup>*) ou d'un allèle de sensibilité (*pvr<sup>+</sup>*) à au moins un potyvirus.

Ce procédé s'inscrit dans le cadre des méthodologies connues dans le domaine de la détection et de la reconnaissance de caractéristiques génétiques de végétaux.

Selon un premier mode de mise en œuvre du procédé, dans lequel le principe de sélection est fondé sur l'affinité des cibles pour une ou plusieurs enzymes de restriction spécifiques, le procédé peut répondre à la méthodologie suivante :

- on amplifie par PCR la séquence codante du gène *eIF4E*, à partir de l'ADN de la plante à tester, par exemple à l'aide des amorces SEQ ID NO: 17 et/ou 18,
- on digère le produit d'amplification avec une enzyme de restriction appropriée ;
- on sépare les éventuels fragments obtenus,

- et on sélectionne les plantes résistantes ou sensibles selon le profil de restriction dudit produit d'amplification.

Par exemple, les plantes sensibles aux potyvirus peuvent être détectées par un profil de restriction faisant apparaître la présence d'un site de coupe par l'enzyme 5 *TspRI* ou l'un de ses isoschizomères et les plantes résistantes aux potyvirus peuvent être détectées par un profil de restriction faisant apparaître l'absence dudit site de coupe par *TspRI* ou l'un de ses isoschizomères et la présence d'un site de coupe par l'enzyme *MspI* ou l'un de ses isoschizomères.

10 L'ADN visé dans ce premier mode de mise en œuvre peut être soit de l'ADN total, soit de l'ADNc, de préférence de l'ADN total. Il va sans dire que les techniques de PCR, digestion enzymatique ou autre southern blot qui peuvent être ici utilisées, sont totalement à la portée de l'homme du métier.

Selon un deuxième mode de mise en œuvre du procédé, correspondant au cas où le mode de sélection est l'hybridation de séquences nucléotidiques complémentaires, 15 le procédé consiste de préférence à :

- à extraire l'ADN des plantes,
- à soumettre éventuellement cet ADN à une digestion enzymatique à l'aide d'au moins une enzyme de restriction,
- à dénaturer l'ADN éventuellement digéré,
- 20 - à mettre en présence l'ADN ainsi dénaturé, avec la sonde elle-même préalablement dénaturée et dotée d'au moins un marqueur, de façon à réaliser l'hybridation,
- à éliminer l'ADN et la sonde non hybridée,
- à révéler l'hybridation à l'aide du marqueur,
- 25 - et à sélectionner des plantes qui possèdent un profil d'hybridation correspondant à la co-ségrégation de la cible hybride avec la sonde marquée et de l'allèle de résistance ou de sensibilité, la distinction entre les plantes sensibles et les plantes résistantes se faisant, de préférence, par la différence de taille des fragments hybrides.

30 L'ADN visé dans ce deuxième mode de mise en œuvre peut être soit de l'ADN total, soit de l'ADNc, de préférence de l'ADN total. Dans le cas où la sonde employée est spécifique de l'allèle de sensibilité aux potyvirus, la mise en évidence de la caractéristique de résistance recherchée, se fait selon des techniques connues de contraste. L'hybridation des molécules simple brin de la sonde et de la cible est effectuée dans des 35 conditions plus ou moins stringentes. De préférence, les conditions d'hybridation stringentes permettant une hybridation sélective sont bien connues de l'homme du métier. En général la température d'hybridation et de lavage est inférieure d'au moins 5°C au Tm de la séquence de référence à un pH donné et pour une force ionique donnée. Typiquement

la température d'hybridation est d'au moins 30°C pour un polynucléotide de 15 à 50 nucléotides et d'au moins 60°C pour un polynucléotide de plus de 50 nucléotides. Voir notamment protocole de l'exemple 2 ci-après. Avec une sonde marquée par exemple à l'aide d'un élément radioactif, tel que le  $^{32}\text{P}$ , ou d'une enzyme greffée, telle que la peroxydase, l'hybridation est aisément révélée qualitativement et quantitativement.

5 Selon un troisième mode de mise en œuvre (parmi d'autres) du procédé selon l'invention, correspondant au cas où le mode de sélection est l'appariement anticorps/antigène, le procédé consiste, de préférence, à détecter la présence d'un polypeptide en partie constitué de tout ou partie d'une des séquences d'acides aminés 10 décrites ci-dessous et incluses dans l'invention. Le procédé peut consister à mettre en contact l'échantillon à tester avec un anticorps tel que décrit ci-dessus puis à détecter le complexe antigène / anticorps formé.

Quel que soit le mode de sélection, le procédé de sélection selon l'invention est fiable et sensible.

15 La présente invention a également pour objet un polynucléotide codant pour une protéine eIF4E mutante comprenant une région dérivée de celle définie par la séquence (I) ci-dessus, par substitution d'au moins un acide aminé neutre de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé, de préférence un acide aminé basique et/ou substitution d'au moins un acide aminé chargé de ladite séquence (I) par un acide aminé 20 neutre ou un acide aminé de charge opposée.

Selon un mode de réalisation préféré, ledit polynucléotide code pour une protéine eIF4E mutante qui comprend une région dérivée de celle définie par la séquence (I) ci-dessus, par :

- 25 a) substitution d'au moins un des acides aminés  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  ou  $X_4$ , de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé, et
- b) substitution d'au moins un des autres acides aminés neutres de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé et/ou substitution d'au moins un acide aminé chargé de ladite séquence (I) par un acide aminé neutre ou un acide aminé de charge opposée.

30 Selon un autre de ses aspects, l'invention concerne une séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est décrite par une séquence choisie dans le groupe comprenant tout ou partie des séquences suivantes:

- SEQ ID NO: 1
- SEQ ID NO: 2
- SEQ ID NO: 3
- SEQ ID NO: 4
- SEQ ID NO: 17
- SEQ ID NO: 18;

- SEQ ID NO : 21;
- SEQ ID NO : 22.

La séquence nucléotidique SEQ ID NO:1 est une séquence d' ADNc obtenue à partir d'ADN de tabac et correspondant au gène *eIF4E* de tabac. La séquence nucléotidique SEQ ID NO: 2 est une séquence connue d'ADN de tomate, dont le numéro d'accésion est AF 259801 dans Genbank. Les séquences SEQ ID NO: 3 et 4 sont des séquences d'ADN comprenant chacune 5 exons et obtenues à partir d'ADN de piment (*Capsicum annuum*), variétés Yolo Wonder et Yolo Y respectivement. Les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 21 et SEQ ID NO : 22 diffèrent respectivement des séquences SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 4 par la présence d'une séquence 3'UTR

La présente invention englobe également les ADNc et ARNm dérivés des séquences SEQ ID NO : 21 et SEQ ID NO : 22, ainsi que toute séquence codante dérivée des séquences SEQ ID NO: 3, 4, 21 ou 22. Ceci englobe notamment les 5 exons identifiés dans ces séquences, qui sont couverts par l'invention, dans leur ensemble ou individuellement.

Il est également question d'amorces dans le cadre de l'invention.

La présente invention a ainsi notamment pour objet des amorces permettant l'amplification d'un gène *eIF4E*, ou d'une portion de celui-ci susceptible de contenir au moins une mutation, telle que définie ci-dessus, associée à la résistance aux potyvirus ; il s'agit notamment d'amorces permettant l'amplification de la séquence de *eIF4E* codant pour la région de *eIF4E* définie par la séquence (I), ou d'une séquence mutante qui en est dérivée.

Des amorces conformes à l'invention peuvent être aisément définies par l'homme du métier, à partir des séquences nucléotidiques SEQ ID NO: 1 à 4, ou à partir des séquences polypeptidiques SEQ ID NO: 5 à 8 si l'on cherche à obtenir des amorces dégénérées. A titre d'exemples non-limitatifs, on citera : les amorces d'amplification constituées par les séquences-amorces nucléotidiques SEQ ID NO: 17 & 18 ; les amorces de clonage SEQ ID NO: 9 à 16 ; les amorces de criblage de banque BAC constituées par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 19 & 20.

Les SEQ ID NO : 17 & 18 sont des amorces issues de la séquence codante de *eIF4E* du piment Yolo Wonder, permettant notamment par amplification PCR puis par digestion enzymatique, la détection des séquences nucléotidiques porteuses des allèles de résistance *pvr2* et de sensibilité *pvr'* aux potyvirus. Les amorces de clonage SEQ ID NO : 9 & 10 dégénérées et les SEQ ID NO : 11 à 16 non dégénérées, ont été définies sur un alignement des séquences de *eIF4E* de tabac, tomate et *Arabidopsis* et utilisées pour la synthèse (RACE) de sondes ADNc de détection d'*eIF4E* dans le génome de tomate et de piment. Les amorces SEQ ID NO: 19 & 20 de criblage de banque BAC sont non dégénérées. Ces amorces SEQ ID NO: 9 à 16, 19 & 20 pourraient éventuellement être

utilisées directement ou indirectement (construction d'outils de sélection) dans la détection de caractéristiques de résistance ou de sensibilité aux potyvirus.

Toutes les séquences similaires à tout ou partie de ces séquences SEQ ID NO: 1 à 20, c'est à dire présentant une ou plusieurs modifications de séquence par rapport aux séquences de référence SEQ ID NO: 1 à 20, font partie intégrante de l'invention. Les modifications qui distinguent ces séquences similaires des séquences de référence peuvent être des délétions, des additions ou des substitutions d'un ou plusieurs nucléotides de la séquence de référence. De manière avantageuse, le pourcentage de similarité est d'au moins 50 %, mieux d'au moins 60%, encore mieux d'au moins 70%, plus spécialement d'au moins 80%, encore plus spécialement d'au moins 90%, et de préférence d'au moins 95% et plus préférentiellement d'au moins 98% par rapport à la séquence de référence.

Les méthodes de mesure de la similarité entre les séquences d'acides nucléiques sont bien connues de l'homme du métier. On peut employer par exemple les programmes PILEUP ou BLAST (notamment Altschul *et al.*, 1993; Altschul *et al.*, 1990). Une " séquence similaire " peut également se définir par sa capacité d'hybridation sélective à la séquence de référence en l'occurrence SEQ ID NO: 1 à 20. Ainsi, l'invention comprend également les séquences qui s'hybrident avec la séquence de référence à un niveau supérieur significatif par rapport au bruit de fond. Le niveau du signal généré par l'interaction entre la séquence capable de s'hybrider de manière sélective et les séquences de référence est généralement 10 fois, de préférence 100 fois plus intense que celui de l'interaction des autres séquences d'ADN générant le bruit de fond. Les conditions d'hybridation stringentes permettant une hybridation sélective sont bien connues de l'homme du métier. En général la température d'hybridation et de lavage est inférieure d'au moins 5°C au Tm de la séquence de référence à un pH donné et pour une force ionique donnée. Typiquement la température d'hybridation est d'au moins 30°C pour un polynucléotide de 15 à 50 nucléotides et d'au moins 60°C pour un polynucléotide de plus de 50 nucléotides. L'exemple 2 ci-après développe plus précisément le protocole d'hybridation utilisé par les inventeurs.

S'agissant des séquences SEQ ID NO: 3, 4, 21, et 22, la présente invention vise également tout fragment de ces séquences. Ceci englobe les régions codantes ou non codantes de ces séquences, par exemple les exons, les introns, la région 3'UTR, etc.

La présente invention a également pour objet une protéine eIF4E mutante comprenant une région dérivée de celle définie par la séquence (I) ci-dessus, par substitution d'au moins un acide aminé neutre de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé, de préférence un acide aminé basique et/ou substitution d'au moins un acide aminé chargé de ladite séquence (I) par un acide aminé neutre ou un acide aminé de charge opposée.

Selon un mode de réalisation préféré, ladite protéine eIF4E mutante comprend une région dérivée de celle définie par la séquence (I) ci-dessus, par :

- a) substitution d'au moins un des acides aminés X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> ou X<sub>4</sub>, de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé, et
- 5 b) substitution d'au moins un des autres acides aminés neutres de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé et/ou substitution d'au moins un acide aminé chargé de ladite séquence (I) par un acide aminé neutre ou un acide aminé de charge opposée.

La présente invention couvre aussi les produits de traduction des 10 séquences nucléotidiques SEQ ID NO: 1,3 & 4, à savoir les polypeptides choisis dans le groupe comprenant tout ou partie des séquences suivantes:

- SEQ ID NO: 5
- SEQ ID NO: 6
- SEQ ID NO: 7
- 15 - SEQ ID NO: 8.

Toutes les séquences similaires à ces séquences SEQ ID NO: 5, 7 & 8, c'est à dire présentant une ou plusieurs modifications de séquence par rapport aux séquences de référence SEQ ID NO: 5, 7 & 8, font partie intégrante de l'invention. Les modifications qui distinguent ces séquences similaires des séquences de référence peuvent 20 être des délétions, des additions ou des substitutions d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence de référence. De manière avantageuse, le pourcentage de similarité est d'au moins 40%, d'au moins 50%, d'au moins 60%, d'au moins 70%, d'au moins 80%, d'au moins 90%, de préférence d'au moins 95% et plus préférentiellement encore d'au moins 98% par rapport à la séquence de référence A/. Les méthodes de mesure de la similarité entre les 25 séquences d'acides aminés sont bien connues de l'homme du métier. On peut employer par exemple les programmes CLUSTALW ou ALIGNP (Thompson et al., 1994).

Les moyens de sélection résistance / sensibilité des plantes aux potyvirus, constitués par des séquences d'acides aminés, sont de préférence utilisés comme cibles permettant le repérage. Il s'agit alors de moyens de sélection indirects qui sous-tendent la 30 mise en œuvre de moyens de détection spécifiques de ces cibles peptidiques. Ces moyens de détection sont avantageusement des anticorps qui constituent un autre objet de la présente invention. Ainsi, ledits anticorps sont caractérisés en ce qu'ils sont spécifiquement dirigés contre tout ou partie d'un au moins des produits de traduction C, et plus particulièrement des séquences d'acides aminés SEQ ID NO: 5 à 8 ou un fragment 35 d'au moins 6 acides aminés de celle-ci. Ces anticorps peuvent être monoclonaux ou polyclonaux.

Les anticorps contre les polypeptides tels que définis ci-dessus peuvent être préparés selon les techniques classiques bien connues de l'homme de métier (par

exemple, Kohler et Milstein, 1975 ; Kozbor et al. 1983, Martineau et al., 1998). Un anticorps selon l'invention pourra comprendre un marqueur détectable isotopique ou non isotopique, par exemple fluorescent, ou encore être couplé à une molécule telle que la biotine selon des techniques bien connues de l'homme de métier.

5 Un autre volet de l'invention a trait aux moyens de sélection formés par des sondes pour la détection de plantes résistantes à au moins un potyvirus, ces sondes étant prises en elles-mêmes. On définit dans ce volet des sondes pour la détection de plantes résistantes à au moins un potyvirus.

10 Une première catégorie de sondes est caractérisée en ce que chaque sonde comprend au moins une séquence correspondant à tout ou partie des SEQ ID NO: 1, 3, 4, 17 et 18. Au sein de cette première catégorie, les sondes comprenant au moins une séquence correspondant à tout ou partie de SEQ ID NO: 1, 3, 4, et notamment à tout ou partie de la portion codant pour la région de la protéine eIF4E définie par la séquence générale (I) sont tout spécialement préférées.

15 15 SEQ ID NO: 3 est une sonde de sensibilité issue du piment Yolo Wonder. Elle se distingue de SEQ ID NO: 4, qui est une sonde de résistance issue du piment Yolo Y, par deux bases nucléotidiques. Ces mutations montrées sur SEQ ID NO: 3 & 4, correspondent aux sites de restriction *TspRI* pour SEQ ID NO: 3 et *Mnvl* pour SEQ ID NO: 4, marquant respectivement la sensibilité aux potyvirus dans Yolo Wonder et la résistance aux potyvirus dans Yolo Y.

Ces sondes sont utilisées pour distinguer les plantes résistantes et sensibles, soit par hybridation sélective et détection de la présence ou de l'absence d'un signal d'hybridation, soit par digestion par une enzyme de restriction appropriée capable de cliver différemment l'allèle de sensibilité et l'allèle de résistance, par exemple *EcoRI*, 25 *TspRI*, ou *Mnvl* suivie de l'hybridation de la sonde avec le produit de restriction. La distinction entre les plantes sensibles et les plantes résistantes se fait dans ce dernier cas par la différence de taille des fragments hybrides.

La présente invention fournit également des outils permettant de réaliser un autre procédé de sélection conforme au premier mode de mise en oeuvre du procédé 30 selon l'invention, tel que défini ci-dessus. Selon ce premier mode, une amplification par PCR de la séquence *eIF4E* est tout d'abord effectuée. L'amplification est suivie d'une digestion sélective par une enzyme de restriction. Les outils qui interviennent sont donc de deux types : enzyme(s) de restriction et amorce(s) PCR permettant d'amplifier la séquence *eIF4E*.

35 La présente invention a notamment pour objet un kit permettant de détecter un allèle de *eIF4E* associé à la résistance ou à la sensibilité aux potyvirus, caractérisée en ce qu'il comprend :

- au moins une enzyme de restriction choisie parmi :

- a) une enzyme reconnaissant un site de restriction I présent dans au moins un allèle de *eIF4E* associé à la sensibilité aux potyvirus, et absent des allèles de *eIF4E* associés à la résistance aux potyvirus ;
- b) une enzyme reconnaissant un site de restriction II présent dans au moins un allèle de *eIF4E* associé à la résistance aux potyvirus, et absent des allèles de *eIF4E* associés à la sensibilité aux potyvirus ; et
- une paire d'amorces nucléotidiques permettant d'amplifier *eIF4E* ou une portion de celui-ci comprenant le site de restriction I et/ou le site de restriction II.

Par exemple :

- pour détecter un allèle de *eIF4E* associé à la sensibilité aux potyvirus, tel que celui représenté par la séquence SEQ ID NO: 3, l'enzyme de restriction est *TspRI*, ou l'un de ses isoschizomères, reconnaissant un site de restriction défini par la séquence sens: NNCASTGN<sup>N</sup> et la séquence antisens ^NNCTSACNN. Les amorces nucléotidiques sont choisies de manière à permettre l'amplification de la totalité de la séquence de *eIF4E* ou d'au moins une portion de celle-ci comprenant le site *TspRI* ;
- pour détecter un allèle de *eIF4E* associé à la résistance aux potyvirus, tel que celui représenté par la séquence SEQ ID NO:4 l'enzyme de restriction est *MvnI*, ou l'un de ses isoschizomères, reconnaissant un site de restriction défini par la séquence sens: CG<sup>N</sup>CG et la séquence antisens : GC<sup>N</sup>GC. Les amorces nucléotidiques sont choisies de manière à permettre l'amplification de la totalité de la séquence de *eIF4E* ou d'au moins une portion de celle-ci comprenant le site *MvnI* ;

Dans les deux cas on peut utiliser par exemple les amorces SEQ ID NO: 25 17 et SEQ ID NO: 18.

Comme indiqué ci-dessus, la détection de plantes sensibles ou résistantes aux potyvirus peut également s'effectuer par détection de la présence ou de l'absence de la forme sauvage ou mutante de la protéine *eIF4E*.

Ainsi, la présente invention englobe l'utilisation d'une protéine *eIF4E* de type sauvage ou mutante, telles que définies ci-dessus, ou d'un anticorps spécifique d'une desdites protéines, pour la sélection de plantes résistantes aux potyvirus.

De préférence, ladite protéine *eIF4E* est choisie parmi :

- la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 5 ;
- la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 6 ;
- la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 7 ;
- la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 8.

Ainsi, une catégorie de moyens de détection de la résistance aux potyvirus conformes à l'invention est caractérisée en ce que chacun de ces moyens

comprend au moins un anticorps spécifique de tout ou partie d'une protéine eIF4E mutante conforme à l'invention, et notamment d'un fragment d'au moins 6 acides aminés de celle-ci portant une mutation, telle que définie ci-dessus, associée à la résistance, telle que définie ci-dessus.

5 Par exemple, un moyen de détection de la résistance peut être constitué par un anticorps spécifique de tout ou partie de la séquence SEQ ID NO: 8, notamment d'un fragment d'au moins 6 acides aminés de celle-ci portant une mutation associée à la résistance.

10 L'invention concerne également des moyens de détection de la sensibilité ou de la résistance aux potyvirus, constituées chacun par au moins une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe comprenant les séquences suivantes :

- SEQ ID NO: 5
- SEQ ID NO: 6
- SEQ ID NO: 7
- 15 - SEQ ID NO: 8,

L'invention concerne plus particulièrement des moyens de détection de la sensibilité aux potyvirus, constitués chacun par au moins un anticorps spécifique d'une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe comprenant les séquences suivantes :

- SEQ ID NO: 5
- 20 - SEQ ID NO: 6
- SEQ ID NO: 7

ou un fragment d'au moins 6 acides aminés de l'une desdites séquences, notamment un fragment de la région de celle-ci définie par la séquence (I).

De préférence, chaque sonde nucléotidique ou autre moyen de détection susvisé est pourvu d'au moins un marqueur, utile comme témoin de l'hybridation nucléotidique ou l'appariement antigène/anticorps au cœur de la détection de la séquence sensible. Avantageusement, ce marqueur est détectable par moyens spectroscopiques, photochimiques, biochimiques, immunochimiques ou encore chimiques. Par exemple un tel marqueur peut consister en un isotope radioactif de  $^{32}\text{P}$ ,  $^3\text{H}$ , en une molécule 30 fluorescente (5-bromodéoxyuridine, fluorescéine, acétylaminofluorène) ou encore en un ligand tel que la biotine. Concernant plus spécialement les sondes nucléotidiques, leur marquage est fait de préférence par incorporation de molécules marquées au sein des polynucléotides par extension d'amorces ou bien par ajout sur les extrémités 3' ou 5'.

35 De manière préférentielle, les séquences utilisées pour détecter les plantes résistantes aux potyvirus sont utilisées en tant que sondes ou amorces nucléotidiques.

Il va de soi que toutes les moyens de détection susvisés ne sont pas limités strictement aux séquences désignées, mais englobent tous les équivalents constitués

notamment par les séquences similaires conservant la fonction concernée et telles que définies ci-dessus.

L'homme du métier connaît parfaitement les différentes méthodes de préparation de sondes et d'amorces, y compris par clonage et par l'action d'enzymes de restriction, ou encore par synthèse chimique directe selon des techniques telles que la méthode au phosphodiester de Brown et al. (1979) ou la technique de support solide décrite dans le brevet européen N° EP 0707592. Les acides nucléiques des séquences, particulièrement des séquences SEQ ID NO: 1 à 4, objets de l'invention peuvent être marqués, si désiré, en incorporant une molécule ou un marqueur détectable comme exposé ci-dessus. Des exemples de marquage non radio-actifs de fragments d'acides nucléiques sont décrits notamment dans le brevet français N° FR 78 10 975 ou encore dans les articles de Urdéa et al., (1988) ou Sanchez-Pescador et al. (1988).

Selon un autre de ses aspects, la présente invention concerne l'utilisation des moyens de détection définis ci-dessus pour la détection de plantes résistantes/ sensibles 15 à au moins un potyvirus.

Conformément à l'invention, on met en œuvre en tant que repère(s) oligonucléotidique(s) de résistance/sensibilité aux potyvirus, les sites de restriction *MvnI* et/ou *TspRI*, au demeurant connus, des séquences *eIF4E*.

De préférence, les sites de restriction utilisés comme repère(s) 20 oligonucléotidique(s) correspondent :

- à la séquence sens : CG<sup>^</sup>CG et à la séquence antisens : GC<sup>^</sup>GC
- et/ou à la séquence sens: NNCASTGNN<sup>^</sup> et à la séquence antisens : ^NNGTSACNN.

L'exploitation de ces sites de restriction comme repères (ou marques ou étiquettes) de 25 résistance aux potyvirus sur des séquences exprimées, est à rapprocher du premier mode de mise en œuvre du procédé de détection sus-décris, dans lequel on a recours à des enzymes de restriction (par exemple : *MvnI* et/ou *TspRI*) et à des amorces d'amplification de la séquence *eIF4E*, par exemple :SEQ ID NO 17 et/ou 18.

Eu égard à la spécificité des sites de restriction *MvnI* & *TspRI*, la 30 présente invention englobe également l'utilisation comme repère(s) oligonucléotidique(s) de résistance/sensibilité aux potyvirus, des susdits sites de restriction *MvnI* & *TspRI*, et, de préférence, du site de restriction correspondant à la séquence sens : CG<sup>^</sup>CG et à la séquence antisens : GC<sup>^</sup>GC et/ou du site de restriction correspondant à la séquence sens: NNCASTGNN<sup>^</sup> et à la séquence antisens : ^NNGTSACNN.

35 Selon encore un autre de ses aspects, la présente invention concerne un kit de sélection de plantes résistantes/ sensibles aux potyvirus comprenant au moins un moyen de détection de type anticorps ou polynucléotide tels que définis *supra*. Le kit

comprend le cas échéant les réactifs nécessaires à la réalisation d'une réaction d'hybridation ou d'amplification.

L'invention a également pour objet les plantes issues du procédé ci-dessus décrit et/ou de la mise en œuvre des outils et/ou de l'utilisation et/ou du kit de 5 sélection définis ci-dessus. De préférence, ces plantes appartiennent à la famille des solanacées, des cucurbitacées et des composées. De manière encore plus préférée, elles sont choisies parmi les tomates, piments et/ou laitue.

A titre d'exemple, les inventeurs réalisent le procédé objet de l'invention en suivant le protocole d'analyse RFLP (polymorphisme de longueur de fragments de 10 restriction). Pour ce faire, les inventeurs ont utilisés un protocole classique de RFLP dans lequel les sondes objets de l'invention sont marquées au  $^{32}\text{P}$  et dans lequel l'ADN des plantes de piment à analyser est digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI*. A l'issue de ce procédé, les inventeurs obtiennent des profils d'hybridation différents entre les plantes résistantes aux potyvirus et les plantes sensibles, permettant ainsi de sélectionner les 15 plantes sensibles ou résistantes. Ces dernières pourront ensuite entrer dans un programme d'amélioration des plantes par croisements successifs.

L'invention ne concerne pas seulement la sélection de plantes résistantes ou sensibles aux potyvirus. En effet, dans la mesure où les inventeurs ont pu identifier le gène *eIF4E* déterminant une résistance récessive aux potyvirus, il est désormais 20 envisageable d'obtenir de nouvelles variétés de plantes génétiquement modifiées, résistantes (ou sensibles) à au moins un potyvirus.

L'invention concerne donc un procédé non biologique d'obtention de nouvelles variétés de plantes génétiquement modifiées, résistantes (ou sensibles) à au moins un potyvirus, caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement à faire en sorte 25 qu'apparaisse et/ou à introduire un allèle de *eIF4E* associé à la résistance (ou à la sensibilité) audit potyvirus dans le génome de ces plantes.

Selon un mode avantageux de mise en œuvre de ce procédé, l'apparition de l'allèle de résistance est provoquée par la mise en œuvre d'une méthode sélectionnée dans le groupe comprenant :

- 30     - mutagenèse, avantageusement "Tilling",
- recombinaison homologue,
- surexpression,
- insertion/délétion,
- "gene silencing" / transgenèse,
- et leurs combinaisons.

Les outils susceptibles d'être mis en œuvre dans le susdit procédé non biologique d'obtention font également partie intégrante de la présente invention.

La présente invention a ainsi pour objet toute unité génétique construite comprenant un polynucléotide conforme à l'invention codant pour une protéine eIF4E mutante, placé sous contrôle d'éléments appropriés de contrôle de la transcription, et éventuellement de la traduction.

5 La présente invention a aussi pour objet toute unité génétique construite caractérisée en ce qu'elle comprend :

- au moins un outil génétique A/ et/ou B/ tel que défini supra,
- et/ou au moins une séquence nucléotidique choisie dans le groupe comprenant tout ou partie des séquences suivantes :

10 - SEQ ID NO: 1

- SEQ ID NO: 3

- SEQ ID NO: 4

- SEQ ID NO: 19

- SEQ ID NO: 20

15 - et/ou au moins une séquence nucléotidique codant pour le gène du facteur eIF4E et comprenant au moins un site de restriction *MvnI*, et/ou *TspRI*, et, de préférence, au moins un site de restriction correspondant à la séquence sens : CG^CG et à la séquence antisens : GC^GC et/ou un site de restriction correspondant à la séquence sens : NNCASTGNN^ et à la séquence antisens : ^NNGTACNN.

20 Un autre outil de transformation génétique couvert par l'invention est constitué par tout vecteur de transformation de cellules végétales comportant au moins une unité génétique construite telle que visée ci-dessus. Il peut s'agir de tout vecteur de clonage connu et approprié (phages / plasmides / cosmides.....).

25 Les cellules végétales et les microorganismes transformés au moyen d'au moins un vecteur et/ou d'au moins une unité génétique construite tels que définis supra, sont également visées par l'invention.

30 A un niveau supérieur, l'invention englobe les plantes transformées au moyen d'au moins un vecteur et/ou d'au moins une unité génétique construite et/ou de cellules végétales transformées et/ou de microorganismes transformés, tels qu'ils ont été décrits ci-dessus.

L'homme du métier connaît bien toutes les techniques directes ou indirectes de modification génétique . Des détails complémentaires sont donnés dans les exemples qui suivent.

35

#### **DESCRIPTION DES FIGURES**

- La Figure 1 représente le gel issu d'une analyse par southern blot et montrant les différences de profils du marqueur *eIF4E* de résistance aux potyvirus, observées

pour différents piments sensibles ou résistants. L'ADN génomique de piment est digéré par l'enzyme *EcoRI* et hybride avec le cDNA *eIF4E* de tabac – SEQ ID NO: 1 – (exemple 3).

- 5 - La Figure 2 représente le gel montrant les amplifications PCR du gène *eIF4E* impliqué dans la résistance aux potyvirus chez le piment et met en évidence un site de restriction *MspI* différentiel entre sensible et résistant. (exemple 4).

#### **EXEMPLES :**

##### *Exemple 1 : Obtention des sondes tomate et piment*

10 Les cDNA de tomate et de piment ont été obtenus par la technique de 3' et 5' RACE (System for Rapid Amplification of cDNA Ends commercialisé par la société Invitrogen™) à partir de l'extraction d'ARN total de tomate et de piment et à l'aide d'amorces dégénérées définies sur un alignement des séquences de *eIF4E* de tabac, tomate et *Arabidopsis*. La partie 3' du cDNA a été clonée par 3'RACE. Des amorces définies entre 15 le TAG et la queue polyA des séquences obtenues par 3'RACE ont été utilisées pour obtenir les cDNA complets par 5'RACE.

Amorces utilisées pour les deux étapes de la 3' RACE :

Etape 1 : TCTAGATACAAYAATATCCAYCACCAAGCAA = SEQ ID NO: 9

Etape 2 : TCTAGATGGGRGCAGACTTCATGTGTT= SEQ ID NO: 10

20 Amorces utilisées pour les trois étapes de la 5'RACE :

**TABLEAU I**

	Piment	Tomate
Etape 1	GTA TGA GAA ACT AAA CTA = SEQ ID NO: 11	AAA TGA GAA ACT AAA CTA = SEQ ID NO: 14
Etape 2	CAA CTT TTC AGT ACG AAT TGT GTT T = SEQ ID NO: 12	CTT TCC AGT ACG AAT TGT GTT TCT T = SEQ ID NO: 15
Etape 3	TCC GAC ATT GCA TCA AGA ATT ATA C = SEQ ID NO: 13	CTG CAT CAA GAA CTA TAC GGT GTA A = SEQ ID NO: 16

##### *Exemple 2 : Test d'hybridation et de sélection des plantes résistantes aux potyvirus (résistance contrôlée par le locus pvr2/pvr1/pvr3)*

25 1- Extraction de l'ADN des plantes à analyser

L'extraction de l'ADN des plantes (Solanacées, Cucurbitacées, Crucifères et Composées) suit les protocole d'extraction standard basée sur le protocole de micro-extraction d'ADN de Fulton et Tanksley, 1995

2- Digestion de l'ADN et séparation sur gel d'agarose

Le protocole suivi utilise 2,5U d'enzyme /  $\mu\text{g}$  d'ADN. Le volume enzymatique doit être inférieur à 10% du volume réactionnel. Le volume réactionnel est calculé en fonction de la taille du puits : il dépend du type de cuve et de peigne utilisés et du volume du gel (300ml en général). Le volume du tampon spécifique de l'enzyme et de la spermidine doivent représenter chacun 10% du volume réactionnel :

- $x \mu\text{l}$  ADN
- 1X tampon
- 1X spermidine (4 mM)
- 2.5 U d'enzyme /  $\mu\text{g}$  d'ADN
- 10 - qsp H<sub>2</sub>O volume réactionnel

La digestion est réalisée à 37°C toute la nuit. En parallèle, sont préparés des échantillons de phages  $\lambda$  digérés par *Hind III* : 0,5 $\mu\text{g}$  / puits. Après digestion, la bonne digestion des ADN est vérifiée sur gel d'agarose 1%, TAE 1X avec 1  $\mu\text{l}$  de produit de digestion. Si la digestion est correcte, le tampon de charge est alors ajouté. Le tampon de charge doit représenter au minimum 10% du volume total (ou 20%). Le dépôt est alors effectué sur un gel de 300ml, NEB 1X, 1% d'agarose contenant 10 $\mu\text{l}$  de BET. La migration se fait à 25V pendant 24h dans du tampon NEB 1X (arrêt de la migration à 2 cm du bord du gel).

#### 3- Transfert sur membrane de nylon

20 Une membrane Hybond N+ et 1 papier Wattman à la taille du gel sont découpés. Dans une cuve plate contenant 1L HCl 0,25N, le gel est mis à tremper 30 min. sous agitation (le bleu devient jaune).

Pendant ce temps, le blotteur est préparé en :

- mouillant une feuille de papier Wattman dans du SSC 2X et en la plaçant sur la plaque poreuse du blotteur.
- 25 - puis en mouillant la membrane et en la plaçant sur le Wattman qui sera recouvert par le cache plastique.

Le gel est rincé dans une cuve contenant de l'H<sub>2</sub>O distillée, puis placé sur le cache du blotteur en évitant les bulles et en vérifiant l'étanchéité du système. Le blotteur est mis en route à 50 mb max. Un peu de soude 0,4N est versée sur le gel. Deux éponges imbibées de soude sont placées sur le gel qui sera recouvert de soude jusqu'à saturation.

Le transfert s'effectue en 2h à 3h. Les membranes sont rincées dans un bain de SSC 2X durant 10 à 15 min puis séchées à l'air libre et cuites 2h à 80°C.

#### 4- Préparation des sondes

35 La préparation des sondes par marquage PCR au <sup>32</sup>P concerne des sondes de 3 kb maximum, amplifiées par PCR ou directement sur plasmides, permettant de révéler les bandes majeures pour une sonde, de concentration entre 1 et 5 ng/ $\mu\text{l}$ .

TABLEAU 2

	Concentration finale	
H <sub>2</sub> O	25,6 µl	
Tp Promega 10 X	4 µl	1X
MgCl <sub>2</sub> Promega	2,4 µl	
Mix (ATG 50 µM+dCTP 5µM)*	2 µl	ATG 2,5µM ; dCTP 0,25 µM
Taq 2U/µl	1 µl	
Primer (5pM)	1 µl	
$\alpha$ 32P-dCTP (1000Ci/mmol, 10µCi/µl)	3 µl	
ADN sonde	1 µl	
Volume réactionnel final	40 µl	

\* : Mix (ATG 50µM+dCTP5µM) pour marquage des sondes RFLP par PCR.

Dilution de dATP, dTTP, dGTP à 10 mM, à partir des solutions mères à 100mM :

- 5 µl dNTP à 100mM
- 45µl H<sub>2</sub>O

Dilution de dCTP à 1 mM, à partir de la solution mère à 100 mM :

- 0,5µl dCTP à 100 mM
- 49,5 µl H<sub>2</sub>O

Mix ATG + dCTP :

- 2,5 µl dATP à 10 mM concentration finale : 50µM
- 2,5 µl dTTP à 10 mM concentration finale : 50µM
- 2,5 µl dGTP à 10 mM concentration finale : 50µM
- 2,5 µl dCTP à 1 mM concentration finale : 5µM
- 490 µl H<sub>2</sub>O

Le marquage des sondes se fait au cours de 30 cycles PCR de :

- 30 s à 94°C
- 45 s à 52 °C
- 1 min 30 à 72 °C

Une fois marquées, les sondes sont ensuite dénaturées selon le protocole suivant :

- ajouter chaque sonde dans un tube contenant 160 µl de NaOH 0,8 N + 2 à 5 µl de Lambda marqué (par random priming)
- incuber 5 min
- neutraliser avec 200 µl de Tris HCl 1M
- 5- Hybridation

Protocole d'après Church et Gilbert, (1984)

a- Préhybridation à 65°C toute la nuit

On utilise 20 ml de tampon d'hybridation\* par tube pour 2 à 6 demi blots. 25 ml de tampon au delà, sans dépasser 10 demi blots par tube. Les membranes sont 5 humidifiées dans une boite contenant du tampon d'hybridation avant d'être légèrement égouttées puis roulees (toutes ensemble) et mises dans le tube.

Vérifier pendant la préhybridation que les tubes sont étanches et que les membranes se déroulent bien, sinon les changer de sens.

\*composition du tampon de pré-hybridation et d'hybridation :

- 10 Pour 500 mL : 21,91 g NaCl; 18,38 g Na Citrate; 380 mL H<sub>2</sub>O; 15 mL SDS 20%; 25 mL NaPO<sub>4</sub> 1M pH 7,5; 25 mL Denhardt 100X; 5 mL EDTA 0,25M; 50 mL Dextran sulfate 50%.

b- Hybridation à 65°C au moins 16 heures

On laisse décroître la température des tubes avant de les ouvrir pour 15 éviter de mouiller le pas de vis. On ajoute la sonde dénaturée (5 min dans NaOH 0,8 M puis arrêt de la dénaturation Tris-HCl 1M). Dans ces conditions, l'hybridation peut durer 48 ou 72 heures.

c- Lavages

Les boites (ou bac) sont lavées dans un large excès de tampon (1% SDS 20 (Serva) 40mM NaPi préchauffé à 65°C. Pour environ 5-10 demi membranes :

- 1 lavage de 20 min. à 65°C sous agitation. Pour laver, transférer membrane par membrane dans un nouveau bac contenant le tampon préchauffé. Les tampons de lavage radioactifs (au moins les 2 premiers) sont versés dans un bidon prévu à cet effet.
- 25 - 1 rinçage de 2-3 min. dans un tampon neuf chauffé à 65°C.

d- Exposition

Les membranes sont essorées sur un lit de papier absorbant constitué d'un 30 champ de papier bleu recouvert de papier blanc type rouleau de Tork ; elles ne doivent pas sécher. Elles sont ensuite mises dans des pochettes plastiques pour l'exposition, placées dans une cassette avec 1 écran intensificateur.

Selon le signal mesuré au compteur Geiger, elles sont exposées à -80°C de une nuit à quelques jours.

e- Déshybridation des membranes avant réhybridation

Les membranes sont déshybridées dans une solution 0,1% SDS 1 mM 35 EDTA chauffée à 80°C (1 litre pour 40 demi-membranes) pendant 20 min à température ambiante. Les membranes sont ensuite rincées 10 min. dans une solution 2X SSC. Enfin, les membranes sont essorées puis stockées humides dans des pochettes en plastique à 4°C.

**Exemple 3 : Vérification que les plantes sélectionnées par le biais de la sonde sont résistantes aux potyvirus (test d'infection chez le piment et la tomate)**

Le matériel viral employé dans ces tests d'infection sont les isolats N-605 du PVY obtenus à partir de *Solanum tuberosum* (Jakab *et al.*, 1997), ou PVY-LYE84, 5 ou PVY-LYE240r pour la tomate (Legnani *et al.*, 1995) et les isolats PVY-To72, PVY-Si15 pour le piment (Dogimont *et al.*, 1996) ainsi que l'isolat CAA-10 du TEV (Légnani *et al.*, 1996). Le même protocole est utilisé pour tous les autres isolats de PVY et de TEV qui sont contrôlés par les locus *pvr2/pvr1/pvr5* et/ou *pot-1*. Les isolats sont maintenus selon la procédure Bos (Bos, 1969) et multipliés sur des plants de *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthii* 10 avant inoculation des plantes de tomate ou de piment au stade cotylédons à deux feuilles étaillées. L'inoculum viral est préparé comme décrit dans les articles de Légnani *et al.* (1995, 1996) et de Dogimont *et al.* (1996). Les cotylédons et les deux premières feuilles des plantes sont inoculés mécaniquement. Les lignées sont évaluées sous conditions contrôlées en chambre de culture (14 heures de jour, 18°C nuit et 24°C jour) pour suivre 15 leur réaction après inoculation. 4 semaines après inoculation, toutes les plantes sont évaluées individuellement pour la présence ou l'absence de l'antigène de capside du PVY ou du TEV par test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) comme décrit par Légnani *et al.*, (1995, 1996) et Dogimont *et al.* (1996). D'autres protocoles parfaitement connus de l'homme du métier peuvent également être utilisés pour l'inoculation mécanique 20 de potyvirus aux plantes.

Le gel présenté en Figure 1 annexée montre la différence de profils observée entre le marqueur *eIF4E* et la résistance aux potyvirus contrôlée par le locus *pvr2*. Cette co-ségrégation complète entre la résistance aux potyvirus et une copie du gène *eIF4E* a été observée sur une descendance en ségrégation de plus de 500 plantes.

25 L'ADN génomique de piment est digéré par l'enzyme *EcoRI* et hybridé avec le cDNA *eIF4E* de tabac - SEQ ID NO: 1 - (les mêmes profils RFLP sont obtenus par hybridation avec le cDNA tomate -SEQ ID NO: 2- et le cDNA piment -SEQ ID NO: 3-).

Les plantes sensibles (S) possèdent le fragment de restriction à 7 kb "bas" alors que les plantes résistantes (R) possèdent les fragment de restriction à 7kb "haut". Les 30 plantes hétérozygotes (Ht) présentent les deux fragment de restriction et sont sensibles (car gène récessif).

**Exemple 4 : Mise en évidence de sites de restriction différentiels entre les copies de *eIF4E* d'un génotype de piment sensible aux potyvirus et d'un génotype résistant.**

35 Par les techniques de séquençage classique, des mutations ponctuelles entre le gène *eIF4E* de la variété de piment "Yolo Wonder" (sensible au potyvirus et porteuse de l'allèle *pvr2<sup>2</sup>*) et celui de la variété de piment "Yolo Y" (résistant aux potyvirus et porteur de l'allèle *pvr2<sup>1</sup>*) ont été mise en évidence. Ainsi, en position 200, la séquence

SEQ ID NO: 3 codante du *eIF4E* dans Yolo Wonder présente un T tandis que la séquence SEQ ID NO: 4 codante du *eIF4E* dans Yolo Y présente un A. De la même façon en position 236, la séquence codante de Yolo Wonder présente un T tandis que la séquence codante de Yolo Y présente un G.

- 5 La première mutation ponctuelle correspond à un site de restriction *TspRI* (ou ses isoschizomères) existant uniquement chez Yolo Wonder. Ce site de restriction différentiel a été validé par PCR sur le cDNA de Yolo Wonder et Yolo Y: définition d'amorces en 5' et en 3' du cDNA et digestion de l'amplifiat PCR par l'enzyme *TspRI*.  
 (Même protocole que ci-dessous pour l'enzyme *MvnI* sauf que la digestion se fait à 70°C pour cette enzyme).

10 La seconde mutation ponctuelle correspond à un site de restriction *MvnI* (ou ses isoschizomères) existant uniquement chez Yolo Y. Ce site de restriction différentiel a été validé par PCR sur le cDNA de Yolo Wonder et Yolo Y: définition d'amorces en 5' et en 3' du cDNA et digestion de l'amplifiat PCR par l'enzyme *MvnI*.

15 Réaction de PCR sur le cDNA :

Amorce sens : AAA AGC ACA CAG CAC CAA CA = SEQ ID NO: 17

Amorce antisens : TAT TCC GAC ATT GCA TCA AGA A = SEQ ID NO: 18

TABLEAU 3

	Concentration finale
H <sub>2</sub> O	13.05 µl
Tp Promega 10 X	2.5 µl 1X
MgCl <sub>2</sub> Promega	2.0 µl
dNTP (4 µM @)	1.25 µl
Taq 2U/µl	1 µl
Primer (10 pM)	1.5 de chaque µl
cDNA (10 ng/µl)	3 µl
Volume réactionnel final	25 µl
Cycles d'amplification : 93°C - 3 min / 35 X (93°C-45 s / 53°C-1 min / 72°C-2 min) / 72°C - 10 min	

20

Digestion par l'enzyme *MvnI* : 8 µl de produit PCR + 2 u d'enzyme + 1,3 µl de tampon de l'enzyme + 13,5 µl H<sub>2</sub>O 2 h à 37°C. Migration sur gel d'agarose 1,2% TAE 1X.

- 25 Le gel présenté en Figure 2 annexée montre les amplifications PCR du gène *eIF4E* impliqué dans la résistance aux polyvirus chez le piment et met en évidence un site de restriction *MvnI* différentiel entre sensible et résistant.

Bandel :

- amplifiat PCR du gène *eIF4E* du piment Yolo Wonder sensible (S) au potyvirus - allèle pvr2+ -
- et absence de digestion enzymatique par *MvnL*.

5 Bande 2 :

- amplifiat PCR du gène *eIF4E* du piment Yolo Y résistant (R) au potyvirus - allèle pvr2<sup>1</sup>
- et mise en évidence du site de restriction *MvnL*.

Bandes 3 :

10 • Marqueur de taille 1 kb ladder

*Exemple 5 : Mise en évidence de la synténie entre piment et tomate pour les gènes recessifs de résistance aux potyvirus (gène pot-1 chez la tomate et locus pvr2 chez le piment)*

15 Cinq gènes majeurs et plusieurs QTL impliqués dans la résistance aux potyvirus sont cartographiés sur le génome du piment. Grâce à l'utilisation de sondes RFLP communes pour cartographier le génome et grâce à la forte conservation de l'ordre des marqueurs entre le génome de la tomate et celui du piment, les facteurs de résistance aux potyvirus du piment sont placés sur la carte de la tomate. La localisation des loci de  
20 résistance aux potyvirus du piment sur les chromosomes de tomate ainsi que celle des marqueurs RFLP liés est récapitulée dans le tableau 1 avec les références d'origine. Dans l'objectif d'établir précisément la correspondance entre les régions génomiques du piment et de la tomate avec les gènes de résistance aux potyvirus, les marqueurs RFLP TG135 et Cab3 sont ajoutés à la carte pré-existante de liaison génétique du piment (Lefebvre et al,  
25 soumis).

**TABLEAU 4.** Gènes de résistance aux Potyvirus cartographiés chez le piment (*Capsicum*) et localisation chromosomique de ces gènes sur le génome de la tomate.

Gène	Spectre	Marqueurs liés <sup>b</sup>	Position chromosomique chez la tomate	Référence
<i>pvr1</i>	TEV, PepMoV*	TG56, TG135	3	Murphy <i>et al.</i> 1998
<i>pvr2</i>	PVY, TEV*	CT31, TG132	3	Caranta <i>et al.</i> 1997 Caranta <i>et al.</i> , unpublished
<i>pvr3</i>	PepMoV*	nd <sup>c</sup>	nd <sup>c</sup>	Murphy <i>et al.</i> 1998
<i>Pvr4</i>	PVY, PepMoV	CD72, CT124	10	Caranta <i>et al.</i> 1999 Grube <i>et al.</i> 2000
<i>pvr5</i>	PVY*	CT31	3	Caranta <i>et al.</i> , unpublished
<i>pvr6</i>	PVMV	TG57	9	Caranta <i>et al.</i> 1996
<i>pvr7</i>	PepMoV, PVY*	CD72, CT124	10	Grube <i>et al.</i> 2000

\* seul le spectre général de résistance est indiqué pour chaque gène, certains de ces gènes 5 de résistance peuvent être détournés par des souches virulentes.

<sup>b</sup> les marqueurs RFLP sont obtenus en utilisant au hasard d'ADN génomique de tomate (TG) ou des sondes ADNc d'épiderme de feuille de tomate (CD and CT).

<sup>c</sup> nd = non déterminé

**a- Marquage AFLP et RFLP du gène *pot-1* (article Parrella *et al.*, sous presse dans 10 TAG)**

L'ADN total est extrait à partir d'environ 1 g de feuilles fraîches de plantes F2 (Caranta *et al.*, 1997).

Les échantillons d'ADN de 6 plantes F2 (issues de l'autofécondation de l'hybride F1 entre *Lycopersicon esculentum* Mospomorist et *L. hirsutum* PI247087) (*pot-1<sup>+</sup>/pot-1<sup>+</sup>*) ayant générés des familles F3 complètement sensibles au PVY souche N 605 et les échantillons d'ADN de 9 plantes F2 ayant générés des familles F3 complètement résistantes au potyvirus sont groupés pour une analyse ségrégante en masse (bulked segregant analysis) et pour un étiquetage AFLP de *pot-1*.

Les marqueurs AFLP sont générés selon le protocole de Vos *et al.* (1995) 20 avec les enzymes de restrictions *EcoRI*, *HindIII*, et *MseI*. La première amplification est réalisée en utilisant une combinaison d'amorces avec un seul nucléotide sélectif et une seconde combinaison avec 3 nucléotides sélectifs.

Les marqueurs AFLP liés à *pot-1* sont cartographiés sur les lignées d'introgression de *L. hirsutum* dans *L. esculentum* (Montforte and Tanksley, 2001) afin 25 d'assigner *pot-1* à un chromosome de la tomate.

- L'assignation est validée par la cartographie de marqueurs RFLP localisés sur le chromosome cible. La procédure RFLP est décrite par Saliba-Colombani et al. (2000). Le criblage du polymorphisme entre *Lycopersicon esculentum Mospomorist* (sensible aux potyvirus) et *L. hirsutum* PI247087 (résistant aux potyvirus) est réalisé avec 3 enzymes de restrictions (*EcoRI*, *HindIII* et *XbaI*) et des marqueurs RFLP préalablement cartographiés chez la tomate (CT, ADNc de tomate dérivé de l'ARNm de tissu épidermique de tomate, TG, clones d'ADN génomique de tomate ; la sonde CAB3 codant pour un polypeptide lié à la chlorophylle a et b, Tanksley et al., 1992) Ce criblage permet de cartographier des marqueurs supplémentaires sur le chromosome 3.
- 10 L'analyse de ségrégation pour les marqueurs moléculaires (AFLP, RFLP) et pour les données de résistance sont analysés par le logiciel Mapmaker/Exp v. 3.0 avec un Lod minimum de 4.0 et un pourcentage de recombinaison maximum de 0,3. Le pourcentage de recombinaison est alors converti en distance de cartographie en centiMorgans (cM) en utilisant la fonction de cartographie Kosambi (Kosambi, 1944).
- 15 Ces résultats ont permis de localiser le gène *pot-1* de résistance au PVY chez la tomate sur le chromosome 3 et de montrer que ce gène était encadré par les mêmes marqueurs RFLP que le locus *pvr2* chez le piment.

#### b- Cartographie de *eIF4E* chez la tomate

- En parallèle, le cDNA *eIF4E* de tabac a été cartographié par la méthode RFLP décrite précédemment sur les lignées d'introgression de *L. pennellii* dans *L. esculentum* (Eshed and Zamir, 1995). Ce travail a permis de localiser 5 copies du gène *eIF4E* chez la tomate. Une de ces copies a été localisée sur le chromosome 3, dans la même région génomique que le gène *pot-1* confirmant ainsi la synténie entre piment et tomate pour la résistance aux potyvirus et par conséquent la possibilité d'utiliser *eIF4E* comme marqueurs et outils de sélection de la résistance.

Le même profil est observé lors d'une hybridation avec le cDNA de tomate (SEQ ID NO: 2) ou de piment (SEQ ID NO: 3). L'ADN génomique est digéré avec EcoRV.

- Cette mise en évidence de synténie entre le piment et la tomate pour les gènes récessifs de résistance aux potyvirus permet de dire que si *eIF4E* est le gène de résistance chez le piment, alors *eIF4E* est également le gène de résistance chez la tomate.

*Exemple 6 : Criblage de la banque BAC du génome du piment avec des amorces définies sur la séquence codante *eIF4E* du génotype Yolo Wonder, démonstration de la co-ségrégation avec la résistance et détermination de la structure génomique du gène *eIF4E* qui co-ségrège avec *pvr2*.*

Une banque BAC de piment a été construite à partir d'une lignée haploïde doublée HD208 issue de l'hybride F1 d'un croisement entre *Capsicum annuum*

Yolo Wonder et *C. annuum* Perennial. HD208 contient l'allèle dominant de sensibilité pvr2+.

L'ADN de haut poids moléculaire a été extrait selon la méthode décrite dans <http://www.ncgr.org/research/jag/papers00/paper300/indexpage300.html>. L'ADN a ensuite été digéré partiellement et séparément par trois enzymes de restriction (*EcoRI*, *BamHI* et *HindIII*) afin d'augmenter la représentativité de l'ensemble du génome. L'ADN digéré a été cloné dans le vecteur pCUGIBAC1.

La banque BAC de piment est constituée de 239.232 clones avec une taille moyenne d'insert de 125kb ce qui correspond à une représentativité théorique de 10 équivalents génome (taille du génome du piment 3000 Mpb). Cette banque BAC a été organisée en 623 pools d'ADN en vue d'un criblage par PCR (1 pool correspond au mélange d'ADN de 384 clones).

Les amores suivantes ont été définies sur la séquence codante de *eIF4E* de Yolo Wonder :

- 15        - Pim1 : 5' AGA CTT TCA TTG TTT CAA GCA TAA 3' = SEQ ID NO: 19  
           - Pim4 : 5' GAT TAG AAA GTG CAA ACA CCA ATA C 3' = SEQ ID NO: 20

Ce couple d'amores amplifie sur le cDNA une bande de 493 pb et sur l'ADN génomique de HD208 une bande de 1800 pb. Ce couple d'amores a été utilisé pour cibler la banque BAC de piment. Quatre clones BAC ont été identifiés portant la bande de 1800 pb (Clones 20 27-BI, 5-2H, 111-4H et 184-4H).

Ces quatre clones BAC ont été digérés par *EcoRI* et les profils de restriction montrent qu'ils sont chevauchants et correspondent donc bien à un même locus. Tous les clones BAC révèlent une bande *EcoRI* de 7 kb qui a été clonée dans un vecteur pGEM3Zf. Cette bande de 7kb, obtenue par digestion *EcoRI* correspond à celle qui co-ségrège avec la sensibilité aux potyvirus (voir exemple 3)

(1 = clone 27-BI ; 2 =clone 5-2H ; 3 = clone 111-4H ; 4 = clone 184-4H)

La présence de l'ampliat de 1800 pb dans ce fragment de 7 kb confirme que ces quatre clones BAC portent le gène *eIF4E* correspondant au cDNA cloné. Le séquençage de cet insert de 7 kb a permis de définir la taille du gène qui est de 5500 pb et 30 de définir la structure exon/intron : 5 exons et 4 introns (voir séquence ID N° 3).

**Exemple 7 : Expérience d'expression transitoire du cDNA *eIF4E* de Yolo Wonder dans un génotype de piment résistant (porteur de l'allèle pvr21) pour validation du rôle de *eIF4E* dans la sensibilité aux Potyvirus.**

35        Afin de valider l'hypothèse que l'allèle de sensibilité pvr2+ correspond au gène *eIF4E* de Yolo Wonder, des expériences d'expression transitoire du cDNA *eIF4E* de Yolo Wonder via un vecteur viral PVX (Potato Virus X) (Chapman et al., 1992) sont réalisées sur un génotype résistant Yolo Y, porteur de l'allèle pvr2<sup>1</sup>.

Le cDNA *eIF4E* issu du génotype sensible Yolo Wonder est cloné de manière orientée dans un vecteur d'expression PVX-CES-35S au site de clonage *ClaI* et *Sall*.

Les deux génotypes de *C. annuum* Yolo Wonder et Yolo Y sont sensibles 5 au PVX : détection du virus par ELISA sur feuilles inoculées et feuilles systémiques 10 jours après inoculation.

Le génotype résistant (porteur de l'allèle pvr2<sup>1</sup>) Yolo Y est co-inoculé avec ce plasmide recombinant et avec le pathotype 0 du Potato Virus Y (PVY). L'expression transitoire du gène *eIF4E* issu du génotype sensible Yolo Wonder via le 10 vecteur PVX recombinant permet au PVY de se multiplier dans le génotype résistant. Le PVY est détecté par la méthode ELISA ou RT-PCR (Legnani et al., 1995, 1996, Dogimont et al., 1996).

*Exemple 8 : Recherche de mutants dans le gène eIF4E et dans les gènes du complexe 15 d'initiation de la traduction des ARN pour la création de plantes résistantes aux potyvirus.*

Les membres de la famille multi-génique *eIF4E* appartiennent à un complexe d'au moins 8 protéines formant le complexe d'initiation de la traduction dans les cellules eucaryotes (Browning 1996).

20 L'identification et la caractérisation de mutants dans *eIF4E* et dans les autres gènes du complexe d'initiation de la traduction pour la création de plantes résistantes aux potyvirus se déroule en 4 étapes et utilise un système de TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes McCallum et al., 2000) :

(1) Génération d'une collection de mutants de tomate par mutagénèse chimique. Le 25 génotype choisi est une microtomate, *Lycopersicon esculentum Microtom* qui présente des caractéristiques biologiques intéressantes (Meissner et al., 2000) : sensible aux potyvirus (PVY, TEV et PVMV), croissance à haute densité (1000 plantes/m<sup>2</sup>) et temps de génération de 3-4 mois. Les mutations sont obtenues par mutagénèse chimique à l'éthyl-méthane sulfonate (EMS) (Koornneef et al., 1982) : 30 mutagénèse sur 30.000 graines, semis des mutants et fabrication de la génération M2 à partir de 5000 plantes M1.

(2) Extraction d'ADN de 20 plantes par famille M2 et constitution de pools d'ADN en 3 dimensions à partir d'une population de 100 000 plantes M2 (5000 familles).

(3) Amplification par PCR des gènes cibles et recherche des mutations par HPLC 35 dénatrante. Les séquences des gènes impliqués dans le complexe d'initiation de la traduction sont disponibles sur le site <http://www.tigr.org/tdb/lgi>. Les produits PCR sont ensuite dénaturés puis appariés pour permettre la formation d'hétéroduplexes. Les mutations sont ensuite détectées soit par HPLC dénatrante

(McCallum et al., 2000) soit par une enzymes qui permet la détection des "mismatch" dans les hétéroduplex (enzyme CEL1, Oleykowski et al., 1998).

- 5           (4) Caractérisation des mutants pour évaluation de leur comportement vis-à-vis des potyvirus : passage d'un phénotype sensible à un phénotype résistant. La procédure d'inoculation et de détection des potyvirus (Potato virus Y, Tobacco etch virus, Pepper veinal mottle virus) est identique à celle décrite dans l'exemple 3.

10           *Exemple 9 : Création de plantes résistantes aux potyvirus par des méthodes pouvant impliquer la transgenèse.*

Alternativement à l'exemple 8, l'allèle de résistance du gène *eIF4E* (identifié ici chez le piment) ou tout autre allèle de *eIF4E* qui confère la résistance aux potyvirus (identifié à la base des exemples 1 à 8) peut être transféré *in planta* par des méthodes de type mutagenèse dirigée (Hohn et al., 1999), recombinaison homologue 15 (Kempin et al., 1997) ou par des méthodes de surexpression. Dans les expériences de surexpression, l'allèle d'*eIF4E* qui confère la résistance est exprimé sous un promoteur fort de type 35S du virus CaMV par transgenèse *in planta* (Jones et al., 1992; Bevan 1984).

20           Des plantes résistance peuvent également être créées par knock-out du gène *eIF4E* endogène par des méthodes de type "gene silencing" (Post Transcriptionnal Gene Silencing) et l'expression simultanées par transgenèse de la forme de *eIF4E* conférant la résistance aux potyvirus. Un knock-out spécifique par PTGS peut-être réalisé en le digérant contre le 5' UTR du gène *eIF4E* endogène; la forme d'*eIF4E* qui confère la résistance exprimée par transgenèse ne portera pas la séquence 5' UTR du *eIF4E* endogène. Cette spécificité du knock-out par PTGS contre les 5' UTR est basé sur les nouvelles 25 données issues de la compréhension du mécanisme de PTGS (Nishikura 2001).

L'ensemble des protocoles décrits ci-dessus sont parfaitement connus de l'homme du métier.

**Bibliographie**

- Altschul et al., 1990, J.Mol.Biol., 215:403-10
- Altschul et al., 1993, J.Mol.Evol., 36:290-300
- Bevan et al., 1984, NAR 12, 8711-8721
- 5 Bos, 1969, Meded. Fac. Landbouwwet Gent. 34, 875-887
- Browning, 1996. Plant Mol. Biol. 32:107-144
- Caranta et al., 1997 Molecular Plant-Microbe Interactions 10(7), 872-878
- Chapman et al., 1992. Plant J. 2(4):549-557
- Church et Gilbert 1984, PNAS 81, 1991-1995
- 10 Dogimont et al., 1996. Euphytica 88:231-239
- Dougherty et Carrington, 1988. Annual review of Phytopathology 26, 123-143
- Flor, 1955. Phytopathol. 45:680-685
- Filatti et al., 1987. Bio/Technology 5:726-730
- Fraser, 1992. Euphytica 63:175-185
- 15 Fulton et Tanksley, 1995.
- Hammond-Kosack et Jones, 1997. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:575-607
- Hohn et al., 1999, PNAS 96, 8321-8323
- Jakab et al., 1997, Journal of General Virology 78, 3141-3145
- Jones et al., 1992, Transgenic research 1, 285-297
- 20 Keller et al., 1998. Mol. Plant-Microbe Interact. 11:124-130
- Kempin et al., 1997, Nature 389, 802-803
- Kohler et Milstein, 1975 Nature 256, 495
- Koornneef et al., 1982. Mutat. Res. 93:109.123
- Kozbor et al. 1983, Hybridoma 2 (1), 7-16
- 25 Langenberg et Zhang, 1997. Journal of Structural Biology 118, 243-247
- Légnani et al, 1995 Euphytica 86, 219-226.
- Légnani et al, 1996, Plant disease, 80 (3), 306-309
- McCallum et al., 2000. Plant Physiol. 123:439-442
- McCormick et al., 1986. Plant Cell Reports 5:81-84
- 30 Martin et Gelie, 1997. European Journal of Plant Pathology 103, 427-431
- Martineau et al., 1998, Journal of Molecular Biology 280 (1), 117-127
- Meissner et al., 2000. Plant J. 22:265-274
- Morel, 2001. Thèse de Doctorat de l'Université de Rennes 1, 136.
- Murphy et al., 1990, Virology 178, 285-288
- 35 Nicolas et al., 1997. Virology 237:452-459
- Nishikura, 2001, Cell 107, 415-418
- Oleykowski et al., 1998. Nucleic Acids Res. 26:4597-4602
- Redondo, 2001. Thèse de Doctorat de l'Université Bordeaux 2, 160pp.

- Riechmann et al., 1992. Journal of General Virology 73, 1-16  
Rodriguez et al., 1998. Plant J. 13(4):465-473.  
Rudd K et al., 1998. J. Biol. Chem. 273 (17) : 10325-10330  
Sambrook et al., 1989 Molecular Cloning : A Laboratory Manual,  
5 Sanchez-Pescador et al., 1988. J. Clin. Microbiol. 26 (10) : 1934-1938  
Schaad et al., 2000. Virology 273:300-306  
Takahashi et al., 1997 Virus genes 14(3), 235-243.  
Urdea et al., 1988. Nucleic Acids Research. 11 : 4937-4957  
Wittman et al. 1997. Virology 234:84-92

## REVENDEICATIONS

- 1) Procédé de sélection de plantes résistantes aux potyvirus, caractérisé en ce qu'il comprend la détection dans les plantes à tester :
- de la présence ou de l'absence d'une protéine eIF4E (dénommée ci-après : « protéine 5 eIF4E de type sauvage ») comprenant une région définie par la séquence (I) ci-après  

$$\text{DX}_1\text{X}_2\text{X}_3\text{X}_4\text{KSX}_5\text{QX}_6\text{AWGSSX}_7\text{RX}_8\text{X}_9\text{YTFSX}_{10}\text{VEX}_{11}\text{FWX}_{12}\text{X}_{13}\text{YNNIHX}_{14}\text{PSKLX}_{15}\text{X}_{16}\text{GAD}$$
dans laquelle :
    - $\text{X}_1, \text{X}_2, \text{X}_3, \text{X}_4, \text{X}_6, \text{X}_7, \text{X}_8, \text{X}_9, \text{X}_{10}, \text{X}_{12}, \text{X}_{13}, \text{X}_{15}$ , et  $\text{X}_{16}$  représentent chacun un acide aminé neutre ;
    - $\text{X}_5$  et  $\text{X}_{14}$  représentent un acide aminé basique ;
    - $\text{X}_{11}$  représente un acide aminé acide ;
    - D, K, S, Q, A, W, G, R, Y, T, F, V, E, N, I, H, P, et L ont leur signification usuelle en code 1-lettre, ou d'une séquence nucléotidique codant pour ladite protéine ;
  - de la présence ou de l'absence d'une protéine eIF4E mutante comprenant une région 15 dérivée de celle définie par la séquence (I), par substitution d'au moins un acide aminé neutre de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé, et/ou substitution d'au moins un acide aminé chargé de ladite séquence (I) par un acide aminé neutre ou un acide aminé de charge opposée, ou d'une séquence codant pour ladite protéine ;
  - et la sélection des plantes où l'on détecte une protéine eIF4E mutante ou une séquence 20 nucléotidique codant pour ladite protéine, et où l'on ne détecte pas de protéine eIF4E de type sauvage ou de séquence codant pour ladite protéine.
- 2) Procédé de sélection de plantes utilisables pour l'obtention de plantes résistantes aux potyvirus, caractérisé en ce qu'il comprend la détection dans les plantes à tester de la présence ou de l'absence d'une protéine eIF4E mutante telle que définie dans la revendication 1, ou d'une séquence codant pour ladite protéine, et la sélection des plantes où l'on détecte ladite protéine eIF4E mutante ou une séquence codant pour ladite protéine.
- 3) Procédé selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que ladite protéine eIF4E mutante comprend une région dérivée de celle définie par la séquence (I), par :
- 30 a) substitution d'au moins un des acides aminés  $\text{X}_1, \text{X}_2, \text{X}_3$  ou  $\text{X}_4$ , de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé, et
  - b) substitution d'au moins un des autres acides aminés neutres de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé et/ou substitution d'au moins un acide aminé chargé de ladite séquence (I) par un acide aminé neutre ou un acide aminé de charge opposée.
- 4) Utilisation d'un outil de sélection choisi parmi :
- a) un polynucléotide codant pour une protéine eIF4E de type sauvage ou mutante, telles que définies dans une quelconque des revendications 1 ou 3 ;

- b) un polynucléotide complémentaire du polynucléotide a) ;
- c) un fragment d'au moins 10 pb d'un polynucléotide a) ou b) ;

pour la sélection de plantes résistantes aux potyvirus.

5 5) Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que les plantes sélectionnées font partie du groupe des solanacées, du groupe des crucifères, du groupe des composées et/ou du groupe des cucurbitacées.

6) Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que les plantes sélectionnées sont des solanacées.

10 7) Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que ladite protéine *eIF4E* est choisie parmi :

- la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 5 ;
- la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 6 ;
- la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 7 ;
- la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 8.

15 8) Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que ledit polynucléotide est choisi parmi :

- le polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 1 ;
- le polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 2 ;
- le polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 3 ;
- le polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 4 ;

ainsi que leurs complémentaires, ou les fragments d'au moins 10 pb desdits polynucléotides ou complémentaires.

20 9) Procédé de sélection de plantes résistantes aux potyvirus, caractérisé en ce que :

- on digère l'ADN extrait d'une plante à tester par une enzyme de restriction appropriée ;
- on dénature l'ADN digéré ;
- on met ledit ADN dénaturé en présence d'une sonde constituée par un polynucléotide tel que défini dans une quelconque des revendications 4 à 8, préalablement pourvu d'au moins un marqueur, de façon à réaliser l'hybridation entre ledit polynucléotide et ledit ADN ;
- on élimine l'ADN et la sonde non hybridés ;
- on révèle l'hybridation à l'aide du marqueur ;
- on sélectionne les plantes qui possèdent un profil d'hybridation correspondant à la co-ségrégation de la cible hybridée avec la sonde marquée et de l'allèle de résistance ou de sensibilité, la distinction entre les plantes sensibles et les plantes résistantes se faisant par la différence de taille des fragments hybridés.

10) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'enzyme de restriction utilisée est *EcoRI*.

11) Procédé de sélection de plantes résistantes aux potyvirus, caractérisé en ce que :

- 5 - on amplifie par PCR la séquence codante du gène *eIF4E*, à partir de l'ADN de la plante à tester ;
- on digère le produit d'amplification avec une enzyme de restriction appropriée ;
- on sépare les éventuels fragments obtenus ;
- et on sélectionne les plantes résistantes ou sensibles selon le profil de restriction dudit produit d'amplification.

12) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que les plantes sensibles aux potyvirus sont détectées par un profil de restriction faisant apparaître la présence d'un site de coupe par l'enzyme *TspRI* ou l'un de ses isoschizomères et les plantes résistantes aux potyvirus sont détectées par un profil de restriction faisant apparaître l'absence dudit site de coupe par *TspRI* ou l'un de ses isoschizomères et la présence d'un site de coupe par l'enzyme *MvnI* ou l'un de ses isoschizomères.

13) Procédé selon une quelconque des revendications 11 ou 12, caractérisé en ce que l'amplification par PCR de la séquence codante du gène *eIF4E*, est effectuée en utilisant comme amores les oligonucléotides SEQ ID NO:17 et SEQ ID NO:18.

14) Polynucléotide codant pour une protéine *eIF4E* mutante telle que définie dans une quelconque des revendications 1 ou 3.

15) Polynucléotide selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe défini par les séquences suivantes :

- 25 - SEQ ID NO: 1
- SEQ ID NO: 3
- SEQ ID NO: 4

16) Polynucléotide utilisable comme amorce pour l'amplification par PCR d'une séquence codant pour une protéine *eIF4E* de plante, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe défini par les séquences suivantes :

- SEQ ID NO: 17
- SEQ ID NO: 18.

17) Kit pour la mise en œuvre d'un procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 35 - au moins une enzyme de restriction choisie parmi :
  - a) une enzyme reconnaissant un site de restriction I présent dans au moins un allèle de *eIF4E* associé à la sensibilité aux potyvirus, et absent des allèles de *eIF4E* associés à la résistance aux potyvirus ;

- b) une enzyme reconnaissant un site de restriction II présent dans au moins un allèle de *eIF4E* associé à la résistance aux potyvirus, et absent des allèles de *eIF4E* associés à la sensibilité aux potyvirus ; et
- une paire d'amorces nucléotidiques permettant d'amplifier *eIF4E* ou une portion de celui-ci comprenant le site de restriction I et/ou le site de restriction II.

- 5 18) Kit selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il comprend :
- une paire d'amorces définies par les séquences SEQ ID NO: 17 et SEQ ID NO: 18 ;
  - au moins une enzyme de restriction choisie parmi *TspRI* ou l'un de ses 10 isoschizomères et *MvnI* ou l'un de ses isoschizomères.

- 19) Utilisation d'un site de restriction par *MvnI* correspondant de préférence à la séquence sens : CG^CG et à la séquence antisens : GC^GC, et/ou d'un site de restriction par *TspRI* correspondant de préférence à la séquence sens : NNCASTGNN^ et à la séquence antisens : ^NNGTSACNN, comme marqueur(s) oligonucléotidique(s) de 15 résistance ou de sensibilité aux potyvirus.

- 20) Utilisation d'une protéine *eIF4E* de type sauvage ou mutante, telles que définies dans une quelconque des revendications 1 ou 3, ou d'un anticorps spécifique d'une desdites protéines, pour la sélection de plantes résistantes aux potyvirus.

- 21) Utilisation selon la revendication 20, caractérisée en ce que ladite 20 protéine *eIF4E* est choisie parmi :
- la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 5 ;
  - la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 6 ;
  - la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 7 ;
  - la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 8.

- 25 22) Protéine *eIF4E* mutante telle que définie dans une quelconque des revendications 1 ou 3.

- 23) Protéine *eIF4E* mutante selon la revendication 22 choisie parmi :
- la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 5 ;
  - la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 7 ;
  - la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 8 ;

- 30 24) Anticorps spécifiquement dirigés contre une protéine *eIF4E* mutante selon une quelconque des revendications 1 ou 3, ou un fragment d'au moins 6 acides aminés dudit polypeptide.

- 35 25) Procédé non biologique d'obtention de plantes résistantes à au moins un potyvirus caractérisé en ce qu'il comprend l'introduction d'un allèle du gène *eIF4E* associé à la résistance audit potyvirus dans le génome desdites plantes.

26) Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce que l'apparition de l'allèle de résistance est provoquée par la mise en oeuvre d'une méthode sélectionnée dans le groupe comprenant :

- mutagenèse, avantageusement "Tilling",
- recombinaison homologue,
- surexpression,
- insertion/délétion,
- "gene silencing" / transgenèse,
- et leurs combinaisons.

10 27) Unité génétique construite, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polynucléotide tel que défini dans une quelconque des revendications 4 à 6, 8.

28) Vecteur de transformation de cellules végétales, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une unité génétique selon la revendication 27.

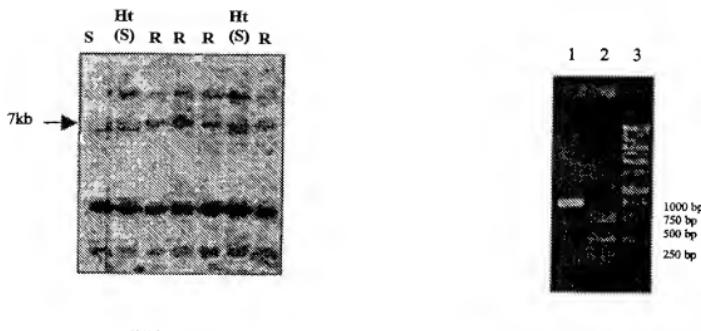
15 29) Cellules végétales transformées au moyen d'au moins un vecteur selon la revendication 28 ou d'au moins une unité génétique selon la revendication 27.

30) Microorganismes transformés au moyen d'au moins un vecteur selon la revendication 28 ou d'au moins une unité génétique selon la revendication 27.

31) Plantes transformées au moyen d'au moins un vecteur selon la revendication 28 ou d'au moins une unité génétique selon la revendication 27.

2835698

1/1



*FIG . I*

*F I2 G*

I

## SEQUENCE LISTING

5 &lt;110&gt; GENOPLANTE-VALOR

10 <120> Procédé de sélection ou d'obtention de plantes résistantes aux  
potyvirus et séquences "marquant" ou "conférant" cette résistance.

15 &lt;130&gt; MJPbv1516/13

20 &lt;150&gt; FR 0201583

25 &lt;160&gt; 23

30 &lt;170&gt; PatentIn version 3.1

35 &lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 961

40 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Nicotiana sp.

&lt;220&gt;

45 &lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1) . . . (961)

50 &lt;223&gt; Séquence cDNA du gène eIF4E

&lt;400&gt; 1

55 gaattccggca cgagggaaaca ttgaactttt cctacgaata caaattcggta atttctgtga 60  
gaagttcacac atttcagtt gaaacccatc accaaaaagtc caaaatcaca aatttccaga 120

cgaaagctat	gtgttgagaa	caccaaattt	gttgcataag	tagagaaacc	ggtgtcgtta	180
gaggaaatcg	agactaatac	tctgtgggtg	gaagaggaaag	gagagatcgt	ggggaaatca	240
5	gacgatacga	tgttgtcttt	aggaaaccca	agcatggcaa	tgaacacacgc	300
	tcatggacat	tttgttgtca	taacccatca	ggggaaatcaa	aacaggctgc	360
	tccatttcac	caattttcac	cttcttcact	gtcagaagatt	tttggagtgt	420
10	atccaccacc	caagcaaattt	ggctgtgggg	gcagactttc	actgttttaa	480
	gagccaaagt	ggggaggatcc	tgtctgcgcc	aacggaggaa	agtggacaat	540
15	aggggttaat	ctgatacacgt	ctggctgtat	acgcgtgtgg	ctatgattgg	600
	gactgcggag	atggaaattt	tggagctgtt	attaatgttc	gagtttagaca	660
20	gttttgtgga	ccaggaatgc	tgccaatgaa	acagctcagg	tgagcattgg	720
	aaggaatttc	tggattacaa	tgactcggtt	ggcttttatat	ttcatgtga	780
	ctagacagag	ctgccaagaa	tcgttattct	gtgttagttct	atcgatcaa	840
25	gaacgcacaca	gttactgaga	acgagtcacc	tgtggctgcc	tgttttgacc	900
	gtatttcacag	tttcataaag	gaaatttgtt	tggtttgaa	aaaaaaaaaa	960
30	a					961
	<210>	2				
35	<211>	696				
	<212>	DNA				
	<213>	Lycopersicon chilense				
40	<220>					
	<221>	misc_feature				
45	<222>	(1)..(661)				
	<223>	numéro d'accession AF 259801 GENBANK				
50	<400>	2				
	atggcaagca	ctgaaaatgga	gagaacgtat	tcgtttgtat	cagctgagaa	60
55	ggccatggag	gaggaggaga	ggtagacgtat	gaacttgaag	aaggtaaaat	120

tcaaatgata	cggcatecgta	tttagggaaa	gaatcacag	tgaagcattcc	attggagcat	180
tcatggactt	tttggtttga	taaccctacc	actaaatctc	gacaaactgc	ttggggaaagc	240
5) tcacttgcac	atgtctcacac	tttctccact	gttggaaaatt	tttgggggtgc	ttacaataat	300
atccatcacc	caaggaaagt	aattatggga	gcagacttcc	attgttttaa	gcacaaaattt	360
10) gagccaaagt	ggaagatcc	tgtatgtcc	aatgggggg	cgtggaaaat	gagttttcg	420
aaaaaggtaat	ctgtatccag	ctggctgtat	acgtgtcg	caatgatgg	acatcaattc	480
gatcatggag	atgaaatttg	tggagcagtt	gttagtgtcc	gggctaaggg	agaaaaaata	540
15) gctttgtgga	ccaagaatgc	tgcaaatgaa	acagtcagg	ttagcattgg	taagcaatgg	600
aangcagtttc	tagattacag	tgattcggtt	ggcttcataat	ttcacgacga	tgcaaagagg	660
ctcgacagaa	atgccaagaa	tcgttacacc	gtatag			696
20)						
	<210>	3				
25)	<211>	687				
	<212>	DNA				
	<213>	Capsicum annuum				
30)						
	<220>					
35)	<221>	misc_feature				
	<222>	(1)..(687)				
	<223>	Séquence codante gène eIF4E				
40)		Génotype Yolo Wonder porteur de l'allèle dominant de sensibilité				
		pvr2+				
	<220>					
45)	<221>	exon				
	<222>	(1)..(278)				
50)	<223>					
	<220>					
55)						

```

<221> exon
<222> (279)..(444)
5 <223>

10 <220>
<221> exon
<222> (445)..(570)
15 <223>

20 <220>
<221> exon
<222> (571)..(636)
25 <223>

30 <220>
<221> exon
<222> (637)..(687)
35 <223>

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (195)..(204)
45 <223> Site de restriction pour Tsp RI

50 <400> 3
      atg gca aca gct gaa atg gag aaa acg acg acg ttt gat gaa gct gag 48
      Met Ala Thr Ala Glu Met Glu Lys Thr Thr Phe Asp Glu Ala Glu
      1           5           10          15

      aag gtc aaa ttg aat gct aat gag gca gat gat gaa gtt gaa gaa ggt 96
      Lys Val Lys Leu Asn Ala Asn Glu Ala Asp Asp Glu Val Glu Glu Gly
      20          25          30

```

gaa att gtt gaa gaa act gat gat acg acg tcg tat ttg agc aaa gaa Glu Ile Val Glu Glu Thr Asp Asp Thr Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Glu 35 40 45	144
5 ata gca aca aag cat cca ita gag cat tca tgg act ttc tgg ttt gat Ile Ala Thr Lys His Pro Leu Glu His Ser Trp Thr Phe Trp Phe Asp 50 55 60	192
10 aat cca gtg gcg aaa tcg aaa caa gct gct tgg ggt agc tcg ctt cgc Asn Pro Val Ala Lys Ser Lys Gln Ala Ala Trp Gly Ser Ser Leu Arg 65 70 75 80	240
15 aac gtc tac act ttc tcc act gtt gaa gat ttt tgg gg t gct tac aat Asn Val Tyr Thr Phe Ser Thr Val Glu Asp Phe Trp Gly Ala Tyr Asn 85 90 95	288
20 aat atc cac cac cca agc aag tta gtt gtg gga gca gac tta cat tgt Asn Ile His His Pro Ser Lys Leu Val Val Gly Ala Asp Leu His Cys 100 105 110	336
ttc aag cat aaa att gag cca aag tgg gaa gat cct gta tgt gcc aat Phe Lys His Lys Ile Glu Pro Lys Trp Glu Asp Pro Val Cys Ala Asn 115 120 125	384
25 gga ggg aca tgg aaa atg agt ttt tca aag ggt aaa tct gat acc agc Gly Gly Thr Trp Lys Met Ser Phe Ser Lys Gly Ser Asp Thr Ser 130 135 140	432
30 tgg cta tat acg ctg ctt gca atg att gga cat caa ttc gat cat gaa Trp Leu Tyr Thr Leu Leu Ala Met Ile Gly His Gln Phe Asp His Glu 145 150 155 160	480
35 gat gaa att tgt gga gca gta gtt agt gtc aga ggt aag gga gaa aaa Asp Glu Ile Cys Gly Ala Val Val Ser Val Arg Gly Lys Glu Lys 165 170 175	528
40 ata tct ttg tgg acc aag aat gct gca aat gaa acg gct cag gtt agc Ile Ser Leu Trp Thr Lys Asn Ala Ala Asn Glu Thr Ala Gln Val Ser 180 185 190	576
45 att ggt aag caa tgg aag cag ttt ctg gat tac agc gac agt gtt ggc Ile Gly Lys Gln Trp Lys Gln Phe Leu Asp Tyr Ser Asp Ser Val Gly 195 200 205	624
50 ttc ata ttt cac gac gat gca aag agg ctc gac aga aat gca aag aat Phe Ile Phe His Asp Asp Ala Lys Arg Leu Asp Arg Asn Ala Lys Asn 210 215 220	672
55 cgt tac aca gta taa Arg Tyr Thr Val 225	687

5    <211> 687  
    <212> DNA  
5    <213> Capsicum annuum

10    <220>  
10    <221> misc\_feature  
10    <222> (1)..(687)  
15    <223> séquence codante gène eIF4E  
          Génotype Yolo Wonder porteur de l'allèle de résistance pvr21

20    <220>  
20    <221> exon  
20    <222> (1)..(278)  
25    <223>

30    <220>  
30    <221> exon  
30    <222> (279)..(444)  
35    <223>

40    <220>  
40    <221> exon  
40    <222> (445)..(570)  
45    <223>

50    <220>  
50    <221> exon  
50    <222> (571)..(636)  
55    <223>

5 <220>  
 ~221> exon  
 .222> (637) .. (687)  
 10 <223>  
 .  
 15 <220>  
 ~221> mutation  
 ~222> (200) .. (200)  
 20 <223> substitution de la thymidine de SEQ ID N°3 par l'adénosine  
 .  
 25 <220>  
 ~221> mutation  
 ~222> (236) .. (236)  
 30 <223> substitution de la thymidine de SEQ ID N°3 par la guanosine  
 .  
 35 <220>  
 ~221> misc\_feature  
 ~222> (233) .. (236)  
 40 <223> Site de restriction de MvnI  
 .  
 45 <400> 4  
 atg gca aca gct gaa atg gag aaa acg acg acg ttt gat gaa gct gag  
 Met Ala Thr Ala Glu Met Glu Lys Thr Thr Phe Asp Glu Ala Glu  
 i 5 10 15  
 50 aag gtg aaa ttg aat gct aat gag gca gat gat gaa gtt gaa gaa ggt  
 Lys Val Lys Leu Asn Ala Asn Glu Ala Asp Asp Glu Val Glu Gly  
 20 25 30  
 55 gaa att gtt gaa gaa act gat gat acg acg tcg tat ttg agc aaa gaa  
 Glu Ile Val Glu Glu Thr Asp Asp Thr Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Glu  
 35 40 45  
 60

ata gca aca aag cat cca tta gag cat tca tgg act ttc tgg ttt gat Ile Ala Thr Lys His Pro Leu Glu His Ser Trp Thr Phe Trp Phe Asp 50                       55                       60	192
5 aat cca gag gcg aaa tcg aaa caa gct gct tgg ggt agc tcc cgt cgc asn Pro Glu Ala Lys Ser Lys Gln Ala Ala Trp Gly Ser Ser Arg Arg 65                       70                       75                       80	240
10 sas gtc tac act ttc tcc act gtt gaa gat ttt tgg gg t gct tac aat Asn Val Tyr Thr Phe Ser Thr Val Glu Asp Phe Trp Gly Ala Tyr Asn 85                       90                       95	288
15 sas atc cac cac cca agc aag tta gtt gtg gga gca gac tta cat tgt Asn Ile His His Pro Ser Lys Leu Val Val Gly Ala Asp Leu His Cys 100                   105                       110	336
20 ttc aag cat aaa att gag cca aag tgg gaa gat cct gta tgt gcc aat Phe Lys His Lys Ile Glu Pro Lys Trp Glu Asp Pro Val Cys Ala Asn 115                   120                       125	384
25 gga ggg aca tgg aaa atg agt ttt tca aag ggt aaa tct gat acc agc Gly Gly Thr Trp Lys Met Ser Phe Ser Lys Gly Lys Ser Asp Thr Ser 130                   135                       140	432
30 tgg cta tat acg ctg ctt gca atg att gga cat caa ttc gat cat gaa Trp Leu Tyr Thr Leu Leu Ala Met Ile Gly His Gln Phe Asp His Glu 145                   150                       155                       160	480
35 gat gaa att tgt gga gca gta gtt agt gtc aga ggt aag gga gaa aaa Asp Glu Ile Cys Gly Ala Val Val Ser Val Arg Gly Lys Gly Glu Lys 165                   170                       175	528
40 ata tct ttg tgg acc aag aat gct gca aat gaa acg gct cag gtt agc Ile Ser Leu Trp Thr Lys Asn Ala Ala Asn Glu Thr Ala Gln Val Ser 180                   185                       190	576
45 att ggt aag caa tgg aag cag ttt ctg gat tac agc gac agt gtt ggc Ile Gly Lys Gln Trp Lys Gln Phe Leu Asp Tyr Ser Asp Ser Val Gly 195                   200                       205	624
50 ttc ata ttt cac gac gat gca aag agg ctc gac aga aat gca aag aat Phe Ile Phe His Asp Asp Ala Lys Arg Leu Asp Arg Asn Ala Lys Asn 210                   215                       220	672
55 cgt tac aca gta taa Arg Tyr Thr Val 225	687
50 <210> 5 <211> 222 <212> FRT	

&lt;213&gt; Nicotiana sp.

5 <220>

<221> DOMAIN

10 <222> (1)..(222)

10 <223> Séquence d'acides aminés issue de la traduction de la séquence codante eIF4E (SEQ ID1)

15 <400> 5

Met Val Asp Glu Val Glu Lys Pro Val Ser Leu Glu Ser Lys Thr  
1 5 10 15

20 Asn Thr Arg Glu Val Glu Glu Gly Glu Ile Val Gly Glu Ser Asp  
20 25 30

25 Asp Thr Met Ser Ser Leu Gly Asn Pro Ser Met Ala Met Lys His Ala  
35 40 45

30 Leu Glu His Ser Trp Thr Phe Trp Phe Asp Asn Pro Ser Gly Lys Ser  
50 55 60

35 Lys Gln Ala Ala Trp Gly Ser Ser Ile Arg Pro Ile Tyr Thr Phe Ser  
65 70 75 80

40 Thr Val Glu Asp Phe Trp Ser Val Tyr Asn Asn Ile His His Pro Ser  
85 90 95

45 Lys Leu Ala Val Gly Ala Asp Phe His Cys Phe Lys Asn Lys Ile Glu  
100 105 110

50 Pro Lys Trp Glu Asp Pro Val Cys Ala Asn Gly Gly Lys Trp Thr Met  
115 120 125

55 Ser Phe Ser Arg Gly Lys Ser Asp Thr Cys Trp Leu Tyr Thr Leu Leu  
130 135 140

55 Ala Met Ile Gly Glu Gln Phe Asp Cys Gly Asp Glu Ile Cys Gly Ala  
145 150 155 160

Val Ile Asn Val Arg Val Arg Gln Glu Lys Ile Ala Leu Trp Thr Arg  
165 170 175

5 Asn Ala Ala Asn Glu Thr Ala Gln Val Ser Ile Gly Lys Gln Trp Lys  
180 185 190

10 Glu Phe Leu Asp Tyr Asn Asp Ser Val Gly Phe Ile Phe His Asp Asp  
195 200 205

15 Ala Lys Lys Leu Asp Arg Ala Ala Lys Asn Arg Tyr Ser Val  
210 215 220

<210> 6

20 <211> 231

<212> PRT

<213> Lycopersicon esculentum

25

<220>

30 <221> DOMAIN

<222> (1)..(231)

<223> Séquence d'acides aminés issue de la traduction de la séquence  
35 codante eIF4E (SEQ ID2)

40 <400> 6

Met Ala Ala Ala Glu Met Glu Arg Thr Met Ser Phe Asp Ala Ala Glu  
1 5 10 15

45 Lys Leu Lys Ala Ala Asp Gly Gly Gly Gly Glu Val Asp Asp Glu Leu  
20 25 30

50 Glu Glu Gly Glu Ile Val Glu Glu Ser Asn Asp Thr Ala Ser Tyr Leu  
35 40 45

Gly Lys Glu Ile Thr Val Lys His Pro Leu Glu His Ser Trp Thr Phe  
55 55 60

Trp Phe Asp Asn Pro Thr Thr Lys Ser Arg Gln Thr Ala Trp Gly Ser  
 65 70 75 80

5 Ser Leu Arg Asn Val Tyr Thr Phe Ser Thr Val Glu Asn Phe Trp Gly  
 85 90 95

Ala Tyr Asn Asn Ile His His Pro Ser Lys Leu Ile Met Gly Ala Asp  
 10 100 105 110

Phe His Cys Phe Lys His Lys Ile Glu Pro Lys Trp Glu Asp Pro Val  
 15 115 120 125

Cys Ala Asn Gly Gly Thr Trp Lys Met Ser Phe Ser Lys Gly Lys Ser  
 130 135 140

20 Asp Thr Ser Trp Leu Tyr Thr Leu Leu Ala Met Ile Gly His Gln Phe  
 145 150 155 160

25 Asp His Gly Asp Glu Ile Cys Gly Ala Val Val Ser Val Arg Ala Lys  
 165 170 175

Gly Glu Lys Ile Ala Leu Trp Thr Lys Asn Ala Ala Asn Glu Thr Ala  
 30 180 185 190

Gln Val Ser Ile Gly Lys Gln Trp Lys Gln Phe Leu Asp Tyr Ser Asp  
 195 200 205

35 Ser Val Gly Phe Ile Phe His Asp Asp Ala Lys Arg Leu Asp Arg Asn  
 210 215 220

40 Ala Lys Asn Arg Tyr Thr Val  
 225 230

45 <210> 7  
 <211> 228  
 <212> PRT

50 <213> Capsicum annuum

55 <220>

<221> DOMAIN  
 ..222> (1)..(228)  
 5 <223> Séquence d'acides aminés issue de la traduction de la séquence codante cIF4E  
 Génotype Yolo Wonder porteur de l'allèle dominant de sensibilité pvr2+ (SEQ ID3)

10 <400> 7  
 Met Ala Thr Ala Glu Met Glu Lys Thr Thr Phe Asp Glu Ala Glu  
 15 1 5 10 15

Lys	Val	Lys	Leu	Asn	Ala	Asn	Glu	Ala	Asp	Asp	Glu	Val	Glu	Glu	Gly
	20						25					30			

20 Glu Ile Val Glu Glu Thr Asp Asp Thr Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Glu  
 35 35 40 45

Ile	Ala	Thr	Lys	His	Pro	Leu	Glu	His	Ser	Trp	Thr	Phe	Trp	Phe	Asp
50					55					60					

25 Asn Pro Val Ala Lys Ser Lys Gln Ala Ala Trp Gly Ser Ser Leu Arg  
 30 65 70 75 80

Asn	Val	Tyr	Thr	Phe	Ser	Thr	Val	Glu	Asp	Phe	Trp	Gly	Ala	Tyr	Asn
35				85				90				95			

35 Asn Ile His His Pro Ser Lys Leu Val Val Gly Ala Asp Leu His Cys  
 40 100 105 110

Phe	Lys	His	Lys	Ile	Glu	Fro	Lys	Trp	Glu	Asp	Pro	Val	Cys	Ala	Asn
115					120						125				

45 Gly Gly Thr Trp Lys Met Ser Phe Ser Lys Gly Lys Ser Asp Thr Ser  
 50 130 135 140

Trp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Leu	Ala	Met	Ile	Gly	His	Gln	Phe	Asp	His	Glu
55	145				150				155		160				

55 Asp Glu Ile Cys Gly Ala Val Val Ser Val Arg Gly Lys Gly Glu Lys  
 60 165 170 175

Ile Ser Leu Trp Thr Lys Asn Ala Ala Asn Glu Thr Ala Gln Val Ser  
180 185 190

5 Ile Gly Lys Gln Trp Lys Gln Phe Leu Asp Tyr Ser Asp Ser Val Gly  
195 200 205

10 Phe Ile Phe His Asp Asp Ala Lys Arg Leu Asp Arg Asn Ala Lys Asn  
210 215 220

15 Arg Tyr Thr Val  
225

<210> 8

20 <211> 228

<212> PRT

<213> Capsicum annuum

25

<220>

30 <221> DOMAIN

<222> (1)..(228)

35 <223> Séquence d'acides aminés issue de la traduction de la séquence  
codante eIF4E  
Génotype Yolo Wonder porteur de l'allèle de résistance pvr21 (SEQ  
ID : 4)

40 <400> 8

Met Ala Thr Ala Glu Met Glu Lys Thr Thr Thr Phe Asp Glu Ala Glu  
1 5 10 15

45 Lys Val Lys Leu Asn Ala Asn Glu Ala Asp Asp Glu Val Glu Glu Gly  
20 25 30

50 Glu Ile Val Glu Glu Thr Asp Asp Thr Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Glu  
35 40 45

55 Ile Ala Thr Lys His Pro Leu Glu His Ser Trp Thr Phe Trp Phe Asp  
50 55 60

Asn Pro Glu Ala Lys Ser Lys Gln Ala Ala Trp Gly Ser Ser Arg Arg  
 65 70 75 80  
 5

Asn Val Tyr Thr Phe Ser Thr Val Glu Asp Phe Trp Gly Ala Tyr Asn  
 85 90 95

10 Asn Ile His His Pro Ser Lys Leu Val Val Gly Ala Asp Leu His Cys  
 100 105 110

15 Phe Lys His Lys Ile Glu Pro Lys Trp Glu Asp Pro Val Cys Ala Asn  
 115 120 125

20 Gly Gly Thr Trp Lys Met Ser Phe Ser Lys Gly Lys Ser Asp Thr Ser  
 130 135 140

Trp Leu Tyr Thr Leu Leu Ala Met Ile Gly His Gln Phe Asp His Glu  
 145 150 155 160

25 Asp Glu Ile Cys Gly Ala Val Val Ser Val Arg Gly Lys Gly Glu Lys  
 165 170 175

30 Ile Ser Leu Trp Thr Lys Asn Ala Ala Asn Glu Thr Ala Gln Val Ser  
 180 185 190

35 Ile Gly Lys Gln Trp Lys Gln Phe Leu Asp Tyr Ser Asp Ser Val Gly  
 195 200 205

40 Phe Ile Phe His Asp Asp Ala Lys Arg Leu Asp Arg Asn Ala Lys Asn  
 210 215 220

Arg Tyr Thr Val  
 225

45 <210> 9

50 <211> 32

<212> DNA

<213> toute variété

55

<220>  
<221> primer\_bind  
5 <222> (1)..(28)  
<223> Amorce de séquence codante eIF4E

10 <400> 9  
tctagataca ayaatatcca ycacccaagc aa 32

15 <210> 10  
<211> 28  
20 <212> DNA  
<213> toute variété

25 <220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(18)  
30 <223> Amorce de séquence codante eIF4E

35 <400> 10  
tctagatggg rgcagacttt caytgttt 28

40 <210> 11  
<211> 18  
<212> DNA  
45 <213> Capsicum annuum

50 <220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(18)  
55 <223> amorce de séquence codante eIF4E

```

<400> 11
gtatgagaaa ctaaaacta
5

<210> 12

<211> 25
10
<212> DNA

<213> Capsicum annuum

15

<220>

20
<221> primer_bind
<222> (1)..(25)

<223> Amorce de séquence codante eIF4E

25

<400> 12
caacttttca gtacgaattt tgttt
25

30
<210> 13

<211> 25

35 <212> DNA

<213> Capsicum annuum

40
<220>

<221> primer_bind
45 <222> (1)..(25)

<223> Amorce de séquence codante eIF4E

50
<400> 13
tccgacatgg catcaagaat tatac
25
55 <210> 14

```

18  
DNA  
Lycopersicon esculentum  
18  
primer\_bind  
(1)..(18)  
Amorce de séquence codante eIF4E  
14  
aaatgagaaa ctaaacta  
18  
15  
25  
DNA  
Lycopersicon esculentum  
30  
15  
primer\_bind  
(1)..(25)  
Amorce de séquence codante eIF4E  
40  
15  
ctttccagta cgaattgtgt ttctt  
25  
16  
25  
DNA  
Lycopersicon esculentum  
55

<220>  
<221> primer\_bind  
5 <222> (1)..(25)  
<223> Amorce de séquence codante eIF4E

10 <400> 16  
ctgcatcaag aactatacgg tgtaa 25

15 <210> 17  
<211> 20  
20 <212> DNA  
<213> Capsicum annuum

25 <220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(20)  
30 <223> Amorce sens de séquence codante eIF4E Yolo Wonder et Yolo Y

35 <400> 17  
aaaaggcacac agcaccaaca 20  
aaaaaggcacac agcaccaaca

40 <210> 18  
<211> 22  
<212> DNA  
45 <213> Capsicum annuum

50 <220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(22)  
55 <223> Amorce antisens de séquence codante eIF4E Yolo Wonder et Yolo Y

```

<400> 18
tatcccgaca ttgcataa aa
5

<210> 19

<211> 24
10 <212> DNA

<213> Capsicum annuum

15 <220>

<221> primer_bind
20 <222> (1)..(24)

<223> Amorce Pim1 de séquence codante eIF4E Yolo Wonder

25 <400> 19
agactttcat tggtaaagg ataa
24

30 <210> 20

<211> 25

35 <212> DNA

<213> Capsicum annuum

40 <220>

<221> primer_bind

45 <222> (1)..(25)

<223> Amorce Pim4 de séquence codante eIF4E Yolo Wonder

50 <400> 20
gattggaaag tgcaaacacc aatac
25

```

5    <211> 811  
 <212> DNA  
 5    <213> Capsicum annuum

10      <220>  
 10      <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(811)

15    <223> séquence codante gène eIF4E et région 3'UTR  
 Génotype Yolo Wonder porteur de l'allèle de dominant de  
 sensibilité pvr+

20      <220>  
 <221> 3'UTR

25    <222> (688)..(811)  
 <223>

30      <400> 21  
 atggcaacag ctgaaatgga gaaaacgacg acgtttgatg aagctgagaa ggtgaaattg        60  
 atatgctaatg aggcagatga tgaagttgaa gaaggtgaaa ttgttgaaga aactgtatgtat  
 35      acgcacgtcg atttgagcaa agaaaatagca acaaaggcata catttagagca ttcatgtact        120  
 ttctgggttg ataatccatgt ggccaaatcg aaacaagctg cttgggttag ctgcgttcgc        180  
 40      aacgtctaca ctttctccac tggtaagat ttttgggtg cttacaataa tatccaccac        240  
 ccaagcaagt tagtttgtgg agcagactta cattgttca agcataaaat tgagccaaag        300  
 tggaaagatc ctgtatgtgc caatggaggg acatggaaaa tgagttttc aaagggtaaa        360  
 45      tctgtatcca gctggctata tacgtgttca gcaatgtttt gacatcaattt cgatcatgaa        420  
 gatgaaattt gtggagcagt agttgtgtc agaggtaagg gagaaaaaat atctttgtgg        480  
 50      accaagaatg ctgcaaatga aacggcttagt gtttagcattt gtaagcaatg gtagcgtttt        540  
 ctggattaca ggcacagtgt tggcttcata tttcaacgacg atgcaaaagag gctcgacaga        600  
 aatgcaaaaga atcgatcac acgtataattc ttgtatgtca gtcggaaat aagaaaacca        660  
 55      attcgtactg aaaagttgaa tcactgtca attcggggcc gctcgacggt cgaccatatg        720  
 attcgtactg aaaagttgaa tcactgtca attcggggcc gctcgacggt cgaccatatg        780

ggagagctcc caacgcgttg gatgcatagc t	811
5 <210> 22	
<211> 811	
10 <212> DNA	
<213> Lycopersicon chilense	
15 <220>	
<221> misc_feature	
20 <222> (1)..(811)	
<223> séquence codante gène eIF4E et région 3'UTR Génotype Yolo Wonder porteur de l'allèle de résistance pvr2l	
25 <220>	
<221> 3'UTR	
30 <222> (688)..(811)	
<223>	
35 <400> 22	60
atggcaacag ctgaaatgga gaaaacgacg acgtttgatg aagctgagaa ggtgaaattg	60
40 atgtctaatt aggcagatga tgaagtggaa gaagggtaaa ttgttgaaga aactgtatgtatc acgcacgtcg atttgaccaa agaaatagca acaaaggatc cattagagca ttcatggact	120
ttctggtttg ataattccaga ggcgaatcg aaacaagctg cttggggtag ctgcgcgtgc	180
45 aacgtctaca ctttctccac ttttgggtgt cttacaataa tatccaccac ccaagcaagt tagtttgtgg agcagactta cattttca agcataaaat tgagccaaag	240
tggaaagatc ctgtatgtgc caatggggg acatggaaaa tgagtttttc aaagggtaaa	300
50 tctgatacca gctggctata tacgtgtcgtt gcaatgattt gacatcaatt cgatcatgaa gtgaaattt gtggagcagt agtttgtgtc agaggtaagg gagaaaaaat atctttgtgg	360
55 accaagaatg ctgaaatga aacggcttag gtttagcattt gtaagcaatg gaaggcagttt	420
	480
	540
	600

ctggattaca gcgcacagtgt tggcttcata ttccacgacg atgcaaagag gctcgacaga 660  
 aatgcaaaga atcgttcacac agtataattc ttgatgcaat gtcggaaatat aagaaaacaca 720  
 5 attcgtaactg aaaagttgaa tcactagtga attcgccggcc gctgcaggc cgaccatatg 780  
 ggagagctcc caacgcgttg gatgcatacg t 811

10 <210> 23  
 <211> 46  
 <212> PRT  
 15 <213> toute variété

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2) .. (5)  
 25 <223> Xaa = A, V, L, I, P, W, F, M, G, S, T, Y, C, Q ou N

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8) .. (8)  
 35 <223> Xaa = H, K ou L

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10) .. (10)  
 45 <223> Xaa = A, V, L, I, P, W, F, M, G, S, T, Y, C, Q ou N

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16) .. (16)  
 55 <223> Xaa = A, V, L, I, P, W, F, M, G, S, T, Y, C, Q ou N

5        <220>  
      <221> MISC\_FEATURE  
      <222> (18) .. (19)  
10      <223> Xaa = A, V, L, I, P, W, F, M, G, S, T, Y, C, Q ou N  
  
15        <220>  
      <221> MISC\_FEATURE  
      <222> (24) .. (24)  
20      <223> Xaa = A, V, L, I, P, W, F, M, G, S, T, Y, C, Q ou N  
  
25        <220>  
      <221> MISC\_FEATURE  
      <222> (27) .. (27)  
30      <223> Xaa = D ou E  
  
35        <220>  
      <221> MISC\_FEATURE  
      <222> (30) .. (31)  
40      <223> Xaa = A, V, L, I, P, W, F, M, G, S, T, Y, C, Q ou N  
  
45        <220>  
      <221> MISC\_FEATURE  
      <222> (37) .. (37)  
50      <223> Xaa = K, L ou H  
  
55        <220>

<221> MISC\_FEATURE  
<222> (42)...(43}  
5 <223> Xaa = A, V, L, I, P, W, F, M, G, S, T, Y, C, Q ou N  
  
<400> 23  
10 Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Ser Xaa Gln Xaa Ala Trp Gly Ser Ser Xaa  
1 5 10 15  
  
15 Arg Xaa Xaa Tyr Thr Phe Ser Xaa Val Glu Xaa Phe Trp Xaa Xaa Tyr  
20 20 25 30  
  
20 Asn Asn Ile His Xaa Pro Ser Lys Leu Xaa Xaa Gly Ala Asp  
35 35 40 45